



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JOSÉ CLEITON SOUSA DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES: DESENVOLVIMENTO DE
ESTRATÉGIAS PARA MODULAÇÃO DE PROPRIEDADES DE ENZIMAS POR
TÉCNICAS FÍSICAS E QUÍMICAS**

FORTALEZA - CE

2015

OPTIMIZACIÓN DE BIOCATALIZADORES: DISEÑO DE ESTRATEGIAS PARA LA MODULACIÓN DEL PROPIEDADES DE ENZIMAS POR TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS



Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

José Cleiton Sousa dos Santos

Directores:

Luciana Rocha Barros Gonçalves
Roberto Fernández Lafuente

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias



Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 2015

JOSÉ CLEITON SOUSA DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES: DESENVOLVIMENTO DE
ESTRATÉGIAS PARA MODULAÇÃO DE PROPRIEDADES DE ENZIMAS POR
TÉCNICAS FÍSICAS E QUÍMICAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: Profa. Dra. Luciana Rocha (UFC) Barros Gonçalves e Prof. Dr. Roberto Fernandez Lafuente (ICP/UAM)

FORTALEZA - CE

2015

Página reservada para ficha catalográfica que deve ser confeccionada após apresentação e alterações sugeridas pela banca examinadora.

Para solicitar a ficha catalográfica de seu trabalho, acesse o site: www.biblioteca.ufc.br, clique no banner Catalogação na Publicação (Solicitação de ficha catalográfica)

JOSÉ CLEITON SOUSA DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES: DESENVOLVIMENTO DE
ESTRATÉGIAS PARA MODULAÇÃO DE PROPRIEDADES DE ENZIMAS POR
TÉCNICAS FÍSICAS E QUÍMICAS**

Tese apresentada ao Doutorado em Engenharia Química do Departamento em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Fernandez Lafuente
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP/CSIC)

Prof. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Benevides Costa Pessela Joao
Instituto de Investigaciones en Ciencias de los Alimentos (CIAL/ CSIC)

Profª. Dra. Lúcia Raquel Marona Rodrigues
Universidade do Minho (UMinho)

*A minha Mãe Maria Sousa, aos meus irmãos
Lucélio Sousa, Auricélia Sousa e a minha Ana
Michele, pessoas que sempre estiveram ao meu
lado, pelo apoio admiração e amores
incondicionais que são imprescindíveis em minha
vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me concedido saúde e disposição para os estudos execução deste trabalho.

À minha família, pelo apoio moral, compreensão, atenção e incentivo na minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes por abrir as porta do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFC para mim.

Ao Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana e Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar, pela oportunidade de trabalhar no Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada – GPTA.

A Profa. Dra Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela orientação do trabalho, pela confiança creditada a mim e pela contribuição para o meu desenvolvimento profissional. Agradeço, também pela oportunidade, paciência e dedicação em fazer de sua experiência profissional e pessoal parte do meu crescimento. Agradeço por ter me proporcionado as principais oportunidades de minha vida acadêmica, contribuições essas que me fizeram acreditar que eu posso ser um profissional cada vez melhor.

Quisiera agradecer a Roberto Fernández Lafuente, del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP), y Universidad Autonoma de Madrid (UAM), siempre disponible para cualquier cosa que he necesitado. Por su apoyo en el laboratorio todo el tiempo, en la solución de dudas y de los problemas que podrían surgir durante el desarrollo de nuestra actividades, en la realización de mi trabajo y por su tutela en mi tesis, muchas gracias.

Quiero agradecer a Prof. Dr. José Berenguer Carlos que haya aceptado ser mi tutor en la Universidad Autonoma de Madrid.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química – DEQ/UFC, pelos conhecimentos adquiridos no curso de Doutorado.

À Profa. Dra. Nadjá Maria Sales de Vasconcelos, com quem iniciei na carreira acadêmica, minha eterna gratidão pela experiência repassada, um exemplo de profissional a ser seguida, uma homenagem especial.

A Cristina Garcia-Galan, mi compañera del laboratorio en el ICP, por su ayuda y colaboración en mi trabajo de Tesis.

Agradeço, em especial, a uma pessoa completamente diferente de mim, mas que me faz espelhar constantemente, uma pessoa maravilhosa que sempre esteve firme comigo, na

compreensão, no respeito, na distância, na sinceridade. Que tem seu interior tão belo, um sorriso marcante, um olhar fascinante, um ser humano grandioso e integro de palavras que me confortam e me faz repensar aos caminhos que devo seguir. Que toca meu coração, a mantê-lo sereno e humilde, essa pessoa que já não posso mais viver sem teus carinhos, a você meu amor, Ana Michele.

Aos amigos do GPBio, Bete, Cristiane, Ulisses, Leonardo, Valderez, e demais bolsistas e integrantes, que fazem desse grupo um ambiente descontraído e agradável de trabalhar, pela saudosa convivência, meu carinho por todo o conhecimento e paciência repassados no desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, que contribuíram para minha formação, trocando experiências, cada um dando sua contribuição para o melhor aprendizado.

Aos meus amigos ueceanos Ana Paula, Cicera, Mário, Thays, Leo, dentre outros, que contribuíram para minha formação, trocando experiências, cada um dando sua contribuição para o melhor aprendizado e por ainda permanecerem com laços de amizades.

Aos amigos que não fazem parte da vida acadêmica: Carol, Roberto, Katia pela amizade e pelos momentos de descontração.

À Universidad Autonoma de Madrid, e ao Instituto de Catálisis y Petroleoquímica. Ao Governo da Espanha, através do projeto CTQ2013-41507.

À Universidade Federal do Ceará e Departamento de Engenharia Química.

A FUNCAP, CNPq e ao Programa Ciências sem Fronteiras – CsF pela bolsa de pesquisa fomentada.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Agradeço a minha família, por sempre estar presente, agradeço pela nossa harmonia, agradeço pelas maravilhas, e por todo o nosso amor.

“Seja quem você for, qualquer posição que você tenha na vida – nível altíssimo ou mais baixo tenha sempre como meta muita força, muita determinação e, sempre, faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”.

(Ayrton Senna)

RESUMO

Este trabalho de tese apresenta suportes ativados com divinilsulfona (DVS) como úteis para a estabilização de enzimas por ligação covalente multipontual, os suportes são muito estáveis, e reagem com diferentes grupos de enzimas em diferentes condições, etc. No entanto, em algumas ocasiões produzem a inativação das mesmas, ou a imobilização é muito lenta, sugerindo que a imobilização não é tão fácil como em outros suportes. O caráter moderadamente hidrofóbico do grupo introduzido pode ter consequências. Tem sido demonstrado que a imobilização pode ser realizada em diferentes valores de pH, e isto parece envolver diferentes áreas das moléculas da proteína, uma vez que após a incubação a pH 10 e subsequente bloqueio, as propriedades são muito diferentes. Além disso, confirmou-se a possibilidade de modular lipases através da imobilização ou subsequente modificação física ou química, que podem ser: não só a estabilidade, mas também a especificidade e seletividade podem ser alteradas significativamente. Essas mudanças não são previsíveis e dependem do substrato, das condições experimentais, e em caso de alterações posteriores, ou do protocolo de imobilização utilizado. Também é mostrado um protocolo simples que permite "*bioimprinting*" da forma aberta de lipases utilizando um detergente para forçar a abertura, e a estabilização desta lipase aberta é conseguida por meio da adição de um polímero iônico revestindo a superfície da proteína.

Palavras chave: enzimas, divinilsulfona, imobilização, modificação química ou física, modulação de propriedades catalíticas.

RESUMEN

Esta tesis muestra que los soportes activados con divinil sulfona (DVS) pueden ser muy útiles para conseguir la estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual, los soportes son muy estables, reaccionan con diferentes grupos de las enzimas en diferentes condiciones, etc. Sin embargo, en ocasiones producen la inactivación de las mismas, o la inmovilización es muy lenta sugiriendo que la inmovilización no es tan sencilla como en otros soportes. El carácter moderadamente hidrofóbico del grupo introducido puede tener consecuencias. Se ha demostrado como la inmovilización puede realizarse a diferentes pHs, y que esto parece implicar diferentes áreas de las moléculas de proteína, ya que tras su incubación a pH 10 y posterior bloqueo, las propiedades son muy diferentes. Por otro lado, se confirma que las lipasas se pueden modular via inmovilización o modificación química o física posterior: no solo la estabilidad, sino también la especificidad y la selectividad pueden alterarse de forma muy significativa. Estos cambios no son predecibles y dependen del sustrato, condiciones experimentales, y en el caso de las modificaciones posteriores, del protocolo de inmovilización utilizado. También se ha mostrado un protocolo muy sencillo que permite “el bioimprinting” de la forma abierta de lipasas usando un detergente para forzar la apertura de las lipasas y estabilizando esta forma abierta por la adición de un polímero iónico que recubre la superficie de la proteína.

Palabras clave: enzimas, divinil sulfona, unión covalente multipuntual, inmovilización, modificación química o física, modulación de propiedades catalíticas.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1	<i>Estrutura da enzima DNA polimerase β, EC 2.7.7.7, código Protein Data Bank (PDB): 7ICG.....</i>	33
Figura 2.2	<i>Figura 2.2 - Estrutura da enzima COMT, código Protein Data Bank (PDB) 3BWM.....</i>	35
Figura 2.3	<i>Estrutura da Lipase de Rhizomucor miehei (RML), em A: conformação aberta, código Protein Data Bank (PDB): 3TGL; em B conformação fechada, código Protein Data Bank (PDB): 4TGL.).....</i>	36
Figura 2.4	<i>Mercado global de enzimas industriais, 2009-2016.....</i>	39
Figura 2.5	<i>Métodos de imobilização de enzimas.....</i>	41
Figura 2.6	<i>Estrutura química da agarose.....</i>	44
Figura 2.7	<i>Mecanismo reacional de ativação da agarose com divinilsulfona (DVS) em pH alcalino, seguida da formação do complexo agarose-vinilsulfona. O mecanismo apresenta também as possibilidades de reação do suporte ativado com grupamentos presentes na superfície das enzimas, por exemplo, grupos amino, tiol e/ou hidroxilo.....</i>	46

Capítulo 3

Figura 3.1	<i>Diferentes modificações químicas realizadas neste trabalho. GLUTA: glutaraldeído; TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico; EDA: etilenodiamina.....</i>	60
Figura 3.2	<i>Cursos de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr. As condições experimentais estão detalhadas na Seção 3.1. (A) Imobilização, na ausência de SDS. Quadrados: octil-agarose; círculos: CNBr-agarose. As linhas sólidas: suspensão, as linhas tracejadas: sobrenadantes. (B) Efeito de SDS sobre os cursos de imobilização de Lecitase em CNBr-agarose. Triângulos: 0,05% SDS (v/v); Losango: SDS a 0,1% (v/v).....</i>	63
Figura 3.3	<i>Efeito do pH sobre a atividade frente a pNPB das diferentes preparações de Lecitase. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 (A) Efeito do protocolo de imobilização: octil-Lecitase: Quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos. (B) (octil-Lecitase) e (C), (CNBr-Lecitase). Efeito da modificação química. Uma modificação: linhas pretas sólidas. Quadrados: Nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza sólidas. Circulo cinza: TNBS, Circulo: GLUTA. Aaminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruz Cinzenta: GLUTA.....</i>	68

Figura 3.4	<i>Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de Lecitase imobilizada. Os experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2. Octil-Lecitase: quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos.....</i>	70
Figura 3.5	<i>Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de octil-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 Uma modificação: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. Aaminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.....</i>	71
Figura 3.6	<i>Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de CNBr-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 Uma modificação: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. Aaminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.....</i>	73
Figura 3.7	<i>A análise de SDS-PAGE de diferentes preparações de octil-Lecitase. Experimentos foram realizados como descrito na seção 2. Linha 1: marcadores moleculares, linha 2: suspensão Lecitase comercial, linha 3: octil-Lecitase, linha 4: aminado-octil-Lecitase, linha 5: glutaraldeído-octil-Lecitase, linha 6: aminado octil-Lecitase tratadas com glutaraldeído, linha 7: glutaraldeído-Lecitase tratada com etilenodiamina.....</i>	79

Capítulo 4

Figura 4.1	<i>Diferentes modificações químicas realizadas neste trabalho. GLUTA: glutaraldeído; TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico; EDA: etilenodiamina.....</i>	94
Figura 4.2	<i>Cursos de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr. As condições experimentais estão detalhadas na Seção 3.1. (A) Imobilização, na ausência de SDS. Quadrados: octil-agarose; círculos: CNBr-agarose. As linhas sólidas: suspensão, as linhas tracejadas: sobrenadantes. (B) Efeito de SDS sobre os cursos de imobilização de Lecitase em CNBr-agarose. Triângulos: 0,05% SDS (v/v); Losango: SDS a 0,1% (v/v).....</i>	97
Figura 4.3	<i>Efeito do pH sobre a atividade frente a pNPB das diferentes preparações de Lecitase. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 (A) Efeito do protocolo de imobilização: octil-Lecitase: Quadrados;</i>	

CNBr-Lecitase: triângulos. (B) (octil-Lecitase) e (C), (CNBr-Lecitase). Efeito da modificação química. Uma modificação: linhas pretas sólidas. Quadrados: Nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza sólidas. Circulo cinza: TNBS, Circulo: GLUTA. Aaminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruz Cinzenta: GLUTA.....

102

Figura 4.4 Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de Lecitase imobilizada. Os experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2. Octil-Lecitase: quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos.....

104

Figura 4.5 Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de octil-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 Uma modificação: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. Aaminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.....

105

Figura 4.6 Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de CNBr-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 Uma modificação: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. Aaminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.....

107

Figura 4.7 A análise de SDS-PAGE de diferentes preparações de octil-Lecitase. Experimentos foram realizados como descrito na seção 2. Linha 1: marcadores moleculares, linha 2: suspensão Lecitase comercial, linha 3: octil-Lecitase, linha 4: aminado-octil-Lecitase, linha 5: glutaraldeído-octil-Lecitase, linha 6: aminado octil-Lecitase tratadas com glutaraldeído, linha 7: glutaraldeído-Lecitase tratada com etilenodiamina.....

113

Capítulo 5

Figura 5.1 Efeito dos detergentes na atividade da Lecitase imobilizada. Atividade foi determinada utilizando pNPB como indicado na seção de métodos. Triângulos: SDS, quadrados: CTAB, Círculos: Triton X-100.....

127

Figura 5.2	<i>Incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.....</i>	128
Figura 5.3	<i>Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição estão descritos na seção de materiais e métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir atividade. Quadrados: CNBr-Lecitase; triângulos: CNBr-Lecitase - SDS revestido com PEI; círculos: CNBr Lecitase-PEI.....</i>	131
Capítulo 6		
Figura 6.1	<i>Efeito dos detergentes na atividade da Lecitase imobilizada. Atividade foi determinada utilizando pNPB como indicado na seção de métodos. Triângulos: SDS, quadrados: CTAB, Círculos: Triton X-100.....</i>	140
Figura 6.2	<i>Incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.....</i>	141
Figura 6.3	<i>Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição estão descritos na seção de materiais e métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir atividade. Quadrados: CNBr-Lecitase; triângulos: CNBr-Lecitase - SDS revestido com PEI; círculos: CNBr Lecitase-PEI.....</i>	144
Capítulo 7		
Figura 7.1	<i>Efeito dos detergentes na atividade da Lecitase imobilizada. Atividade foi determinada utilizando pNPB como indicado na seção de métodos. Triângulos: SDS, quadrados: CTAB, Círculos: Triton X-100.....</i>	153
Figura 7.2	<i>Incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.....</i>	154
Figura 7.3	<i>Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição estão descritos na seção de materiais e métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir atividade. Quadrados: CNBr-Lecitase; triângulos: CNBr-Lecitase - SDS revestido com PEI; círculos: CNBr Lecitase-PEI.....</i>	157
Capítulo 8		
Figura 8.1	<i>Diferentes modificações químicas realizadas neste trabalho. GLUTA: glutaraldeído; TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico; EDA: etilenodiamina.....</i>	167
Figura 8.2	<i>Cursos de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr. As condições experimentais estão detalhadas na Seção 3.1. (A) Imobilização, na ausência de SDS. Quadrados: octil-agarose; círculos: CNBr-agarose. As linhas sólidas: suspensão, as linhas tracejadas: sobrenadantes. (B)</i>	

	<i>Efeito de SDS sobre os cursos de imobilização de Lecitase em CNBr-agarose. Triângulos: 0,05% SDS (v/v); Losango: SDS a 0,1% (v/v).....</i>	170
Figura 8.3	<i>Efeito do pH sobre a atividade frente a pNPB das diferentes preparações de Lecitase. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 (A) Efeito do protocolo de imobilização: octil-Lecitase: Quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos. (B) (octil-Lecitase) e (C), (CNBr-Lecitase). Efeito da modificação química. Uma modificação: linhas pretas sólidas. Quadrados: Nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza sólidas. Circulo cinza: TNBS, Circulo: GLUTA. Aaminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruz Cinzenta: GLUTA.....</i>	175
Figura 8.4	<i>Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de Lecitase imobilizada. Os experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2. Octil-Lecitase: quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos.....</i>	177
Figura 8.5	<i>Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de octil-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 Uma modificação: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. Aaminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.....</i>	178
Figura 8.6	<i>Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de CNBr-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 Uma modificação: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. Aaminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.....</i>	180
Figura 8.7	<i>A análise de SDS-PAGE de diferentes preparações de octil-Lecitase. Experimentos foram realizados como descrito na seção 2. Linha 1: marcadores moleculares, linha 2: suspensão Lecitase comercial, linha 3: octil-Lecitase, linha 4: aminado-octil-Lecitase, linha 5: glutaraldeído-octil-Lecitase, linha 6: aminado octil-Lecitase tratadas com glutaraldeído, linha 7: glutaraldeído-Lecitase tratada com etilenodiamina.....</i>	186

Capítulo 9

- Figura 9.1** Efeito sobre a atividade da enzima durante incubação com os polímeros iônicos com diferentes preparações de Lecitase imobilizadas. A quantidade de polímero foi de 50 mg /g de biocatalisador, e a incubação foi realizada a pH 7 (PEI de 25 kDa) ou de pH 5 (DS de 20 kDa) e 25°C. Outras condições são descritas nos métodos. Incubação com DS é mostrada no painel A, a incubação com PEI é mostrada no painel B. Quadrados: CNBr-Lecitase, Triângulos: Octil-Lecitase. Linha contínua: incubação com o polímero. A linha tracejada: referência na ausência de polímero..... 202
- Figura 9.2** Efeito sobre a atividade enzimática durante incubação com PEI, sob condições ótimas e diferentes preparações de Lecitase imobilizada (A) e em 1M de NaCl (B). O revestimento foi realizado utilizando PEI de 25 kDa, 25 °C, pH 7 e 10 mg / g de biocatalisador (painel A), no painel B NaCl 1 M foi adicionada para prevenir a troca iônica com polímero. Quadrados: CNBr-Lecitase; Triângulos: Octil-Lecitase. Linha contínua: incubação com o polímero; linha tracejada: referência na ausência de polímero..... 204
- Figura 9.3** Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição são descritos na seção Métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir a atividade. 100% de atividade relativa em relação a atividade inicial de cada preparação. Quadrado: CNBr Lecitase; Triângulos: Octil-Lecitase; Círculos: CNBr Lecitase-PEI..... 205
- Figura 9.4** Efeito do pH sobre a atividade em pNPB de diferentes preparações de Lecitase. Atividade foi determinada como descrito na seção Métodos a 25 °C. 100% foi a atividade máxima para cada biocatalisador. Painel A: CNBr-Lecitase, Painel B: octil-Lecitase. Quadrados, linha tracejada: preparação não modificada; Triângulos, linha sólida: biocatalisador revestido com PEI; Círculos: biocatalisador revestido com DS..... 206
- Figura 9.5** Curso de inativação de diferentes preparações Lecitase em 30% de acetonitrilo. Atividade foi determinada como descrito na seção Métodos a 25 °C. 100% foi a atividade máxima para cada biocatalisador. Painel A: CNBr-Lecitase, Painel B: octil-Lecitase. Quadrados, linha tracejada: preparação não modificada; Triângulos, linha sólida: biocatalisador revestido com PEI; Círculos: biocatalisador revestido com DS..... 208

Capítulo 10

- Figura 10.1** Efeito dos detergentes na atividade da Lecitase imobilizada. Atividade foi determinada utilizando pNPB como indicado na seção de métodos. Triângulos: SDS, quadrados: CTAB, Círculos: Triton X-100..... 220
- Figura 10.2** Incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS..... 221

Figura 10.3 *Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição estão descritos na seção de materiais e métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir atividade. Quadrados: CNBr-Lecitase; triângulos: CNBr-Lecitase - SDS revestido com PEI; círculos: CNBr Lecitase-PEI.....* 224

LISTA DE TABELAS

	Capítulo 2	
Tabela 2.1	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	49
	Capítulo 3	
Tabela 3.1	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	65
Tabela 3.2	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	77
Tabela 3.3	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	82
	Capítulo 4	
Tabela 4.1	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	99
Tabela 4.2	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	111
Tabela 4.3	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	116
	Capítulo 5	
Tabela 5.1	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	127
Tabela 5.2	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	129
	Capítulo 6	
Tabela 6.1	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	140
Tabela 6.2	<i>Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....</i>	142
	Capítulo 7	
Tabela 7.1	<i>Efeito da presença de detergentes na atividade de CNBr-Lecitase. CNBr-Lecitase foi incubado a pH 7 e 25°C em 25mM de fosfato de sódio com concentração indicada de detergente, durante 24 h. Em seguida, as preparações foram lavadas e a atividade do biocatalisador foi medida utilizando pNPB (ver métodos). * 100 é a atividade inicial do biocatalisador.....</i>	153

Tabela 7.2	<i>Atividade recuperada dos derivados de CNBr- Lecitase incubados em polímeros e /ou detergentes. O revestimento da enzima é descrito na seção de métodos. Atividade foi determinada utilizando pNPB como o substrato. O polímero foi adicionado à suspensão depois de incubação com o detergente. A atividade é dada como atividade relativa (100 corresponde a enzima não modificada) após 24 h de incubação no detergente e/ou polímero, lavagem com água e incubação a 25°C em tampão durante mais 24 h.....</i>	155
Capítulo 8		
Tabela 8.1	<i>Efeito das modificações químicas sobre as atividades frente a pNPB das diferentes preparações. A atividade foi determinada a pH 7 e 25 °C, tal como indicado no ponto 2. GLUTA, glutaraldeído. A atividade é determinada como U/mg.....</i>	172
Tabela 8.2	<i>Estabilidade térmica das diferentes preparações de enzimas modificados dadas como meia-vida em minutos. As temperaturas foram 55 oC em pH 7, 53 oC em pH 9 e pH 5 e 49 oC. Outras especificações estão descritas na Seção 2.....</i>	184
Tabela 8.3	<i>Atividade de diferentes preparações Lecitase contra diferentes substratos. Os detalhes experimentais podem ser encontrados na Seção 2 RM, R metil mandelato; MPA, fenilacetato de metilo. XXX significa atividade muito baixa para ser determinada. A atividade é determinada em U/mg.....</i>	189
Capítulo 9		
Tabela 9.1	<i>Efeito dos diferentes parâmetros sobre a atividade recuperada de diferentes preparações de Lecitase após a incubação em soluções de PEI. 100% correspondem à atividade da preparação de Lecitase indicada na ausência de PEI. O revestimento foi realizado a 25 oC durante 24h.....</i>	203
Tabela 9.2	<i>A estabilidade térmica das diferentes preparações Lecitase em diferentes condições. As meias-vidas são dadas em horas. Outras especificações estão descritos em métodos.....</i>	207
Tabela 9.3	<i>Atividade de diferentes preparações de Lecitase contra diferentes substratos. Os detalhes experimentais podem ser encontrados na seção de métodos. EH: hexanoato de etila; MPA, fenilacetato de metila; RMM: R metil mandelato; nda: nenhuma atividade detectável. A atividade é determinada como U/mg...</i>	209
Capítulo 10		
Tabela 10.1	<i>Efeito da presença de detergentes na atividade de CNBr-Lecitase. CNBr-Lecitase foi incubado a pH 7 e 25°C em 25mM de fosfato de sódio com concentração indicada de detergente, durante 24 h. Em seguida, as preparações foram lavadas e a atividade do biocatalisador foi medida utilizando pNPB (ver métodos). * 100 é a atividade inicial do biocatalisador.....</i>	220
Tabela 10.2	<i>Atividade recuperada dos derivados de CNBr- Lecitase incubados em polímeros e /ou detergentes. O revestimento da enzima é descrito na seção</i>	

de métodos. Atividade foi determinada utilizando pNPB como o substrato. O polímero foi adicionado à suspensão depois de incubação com o detergente. A atividade é dada como atividade relativa (100 corresponde a enzima não modificada) após 24 h de incubação no detergente e/ou polímero, lavagem

com água e incubação a 25°C em tampão durante mais 24 222 h.....

SUMÁRIO

	Capítulo 1 – Introdução.....	28
1.	Introdução.....	29
1.1	Objetivos gerais.....	31
1.1.1	Objetivos específicos.....	31
	 Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica.....	 32
2.	Revisão Bibliográfica.....	33
2.1	Enzimas.....	33
2.2	Tecnologia enzimática.....	37
2.3	Imobilização de enzimas.....	40
2.4	Suportes para imobilização de enzimas.....	42
2.4.1	Resinas acrílicas.....	42
2.4.2	Polímeros naturais.....	43
2.4.2.1	Agarose como suporte para imobilização de enzimas.....	44
2.4.2.2	Ativação do suporte para imobilização de enzimas.....	45
2.4.3	Polímeros inorgânicos.....	47
2.4.4	Imobilizações em nano partículas magnéticas.....	48
2.5	Modificação Química de Enzimas.....	48
2.6	Modificação em fase sólida de enzimas com polímeros.....	51
	 Capítulo 3 - Caracterização de suporte agarose ativada com divinilsulfona para a estabilização de enzimas imobilizadas por ligação covalente multipontual.....	 52
3.1	Resumo.....	53
3.1	Palavras-chave.....	53
3.2	Introdução.....	54
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.3.1	Determinação da atividade enzimática.....	58
3.3.2	Imobilização de Lecitase em octil agarose.....	58
3.3.3	Imobilização de Lecitase em CNBr agarose.....	58
3.3.4	Modificação química de Lecitase imobilizada.....	59
3.3.4.1	Aminação em fase sólida de Lecitase.....	59

3.3.4.2	<i>Modificação dos grupos amino primários de Lecitase imobilizada com TNBS.....</i>	60
3.3.4.3	<i>Modificação de Lecitase imobilizada com Glutaraldeído.....</i>	61
3.3.5	<i>Inativação térmica de diferentes Lecitase imobilizado preparações.....</i>	61
3.3.6	<i>Hidrólise de fenilacetato de metila.....</i>	61
3.3.7	<i>Hidrólise de R e S mandelato de metilo.....</i>	62
3.3.8	<i>Ensaio de SDS-PAGE.....</i>	63
3.4	RESULTADOS.....	63
3.4.1	<i>Imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr.....</i>	63
3.4.2	<i>Efeito das modificações químicas sobre a atividade da enzima.....</i>	64
3.4.3	<i>Efeito do pH sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase.....</i>	66
3.4.4	<i>Efeito da presença de detergentes na atividade da enzima.....</i>	69
3.4.5	<i>Estabilidade Térmica.....</i>	77
3.4.6	<i>Especificidade das diferentes preparações.....</i>	80
3.4.7	<i>Enantio-especificidade das diferentes preparações.....</i>	85
3.5	CONCLUSÃO.....	85

Capítulo 4 – Desenvolvimento de protocolos para a imobilização/estabilização de enzimas em esferas de agarose ativada com divinilsulfona Bibliográfica..... 86

4.1	<i>Resumo.....</i>	87
4.1	<i>Palavras-chave.....</i>	87
4.2	<i>Introdução.....</i>	88
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	91
4.3.1	<i>Determinação da atividade enzimática.....</i>	92
4.3.2	<i>Imobilização de Lecitase em octil agarose.....</i>	92
4.3.3	<i>Imobilização de Lecitase em CNBr agarose.....</i>	92
4.3.4	<i>Modificação química de Lecitase imobilizada.....</i>	93
4.3.4.1	<i>Aminação em fase sólida de Lecitase.....</i>	93
4.3.4.2	<i>Modificação dos grupos amino primários de Lecitase imobilizada com TNBS.....</i>	94
4.3.4.3	<i>Modificação de Lecitase imobilizada com Glutaraldeído.....</i>	95
4.3.5	<i>Inativação térmica de diferentes Lecitase imobilizado preparações.....</i>	95

4.3.6	<i>Hidrólise de fenilacetato de metila.....</i>	95
4.3.7	<i>Hidrólise de R e S mandelato de metilo.....</i>	96
4.3.8	<i>Ensaio de SDS-PAGE.....</i>	97
4.4	RESULTADOS.....	97
4.4.1	<i>Imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr.....</i>	97
4.4.2	<i>Efeito das modificações químicas sobre a atividade da enzima.....</i>	98
4.4.3	<i>Efeito do pH sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase.....</i>	100
4.4.4	<i>Efeito da presença de detergentes na atividade da enzima.....</i>	103
4.4.5	<i>Estabilidade Térmica.....</i>	111
4.4.6	<i>Especificidade das diferentes preparações.....</i>	114
4.4.7	<i>Enantio-especificidade das diferentes preparações.....</i>	119
4.5	CONCLUSÃO.....	119
	 Capítulo 5 – Modulação de lipase imobilizadas em suporte ativado com divinilsulfona em diferentes condições Revisão Bibliográfica.....	120
5.1	<i>Resumo.....</i>	121
	<i>Palavras-chave.....</i>	121
5.2	<i>Introdução.....</i>	122
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	124
5.3.1	<i>Materiais.....</i>	124
5.3.2	<i>Determinação da atividade enzimática.....</i>	124
5.3.3	<i>Imobilização de Lecitase em octil agarose.....</i>	125
5.3.4	<i>Imobilização de Lecitase em CNBr agarose.....</i>	125
5.3.5	<i>Revestimento de imobilizada por Lecitase polímero iônico.....</i>	125
5.3.6	<i>Inativação térmica de diferentes preparações de Lecitase imobilizada.....</i>	126
5.4	RESULTADOS	126
5.4.1	<i>Efeito do detergente nas propriedades da enzima.....</i>	126
5.4.2	<i>Efeito da incubação da enzima imobilizada na presença de polímeros e detergentes.....</i>	128
5.3.3	<i>Estudo da acessibilidade dos resíduos catalíticos de Ser para o meio.....</i>	130
5.4	CONCLUSÕES.....	132

Capítulo 6 - Modulação de lipase imobilizada alterando as propriedades físicas do suporte ativado com DVS; efeito do agente de bloqueio sobre as propriedades catalíticas		133
6.1	<i>Resumo</i>	134
	<i>Palavras-chave</i>	134
6.2	<i>Introdução</i>	135
6.3	MATERIAIS E MÉTODOS	137
6.3.1	<i>Materiais</i>	137
6.3.2	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	138
6.3.3	<i>Imobilização de Lecitase em CNBr agarose</i>	138
6.3.4	<i>Revestimento de imobilizada por Lecitase polímero iônico</i>	138
6.3.5	<i>Inativação térmica de diferentes preparações de Lecitase imobilizada</i>	138
6.3.6	<i>Inativação de diferentes preparações de Lecitase na presença de co-solvente orgânico</i>	139
6.4	RESULTADOS	139
6.4.1	<i>Efeito do detergente nas propriedades da enzima</i>	139
6.4.2	<i>Efeito da incubação da enzima imobilizada na presença de polímeros detergentes</i>	141
6.3.3	<i>Estudo da acessibilidade dos resíduos catalíticos de Ser para o meio</i>	143
6.4	CONCLUSÕES	145
Capítulo 7 – Aperfeiçoamento das propriedades de Lecitase via modificação química em fase sólida: efeito do protocolo de imobilização		146
7.1	<i>Resumo</i>	147
	<i>Palavras-chave</i>	147
7.2	<i>Introdução</i>	148
7.3	MATERIAIS E MÉTODOS	150
7.3.1	<i>Materiais</i>	150
7.3.2	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	150
7.3.3	<i>Imobilização de Lecitase em octil agarose</i>	151
7.3.4	<i>Imobilização de Lecitase em CNBr agarose</i>	151
7.3.5	<i>Revestimento de imobilizada por Lecitase polímero iônico</i>	151

7.3.6	<i>Inativação térmica de diferentes preparações de Lecitase imobilizada.....</i>	152
7.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	152
7.4.1	<i>Efeito do detergente nas propriedades da enzima.....</i>	152
7.4.2	<i>Efeito da incubação da enzima imobilizada na presença de polímeros: detergentes.....</i>	154
7.4.3	<i>Estudo da acessibilidade dos resíduos catalíticos de Ser para o meio.....</i>	156
7.5	CONCLUSÕES.....	158

Capítulo 8 – Melhoria das propriedades catalíticas de Lecitase imobilizada através do revestimento físico com polímeros iônico.....

8.1	Resumo.....	160
	Palavras-chave.....	160
8.2	Introdução.....	161
8.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	164
8.3.1	<i>Determinação da atividade enzimática.....</i>	165
8.3.2	<i>Imobilização de Lecitase em octil agarose.....</i>	165
8.3.3	<i>Imobilização de Lecitase em CNBr agarose.....</i>	165
8.3.4	<i>Modificação química de Lecitase imobilizada.....</i>	166
8.3.4.1	<i>Aminação em fase sólida de Lecitase.....</i>	166
8.3.4.2	<i>Modificação dos grupos amino primários de Lecitase imobilizada com TNBS</i>	167
8.3.4.3	<i>Modificação de Lecitase imobilizada com Glutaraldeído.....</i>	168
8.3.5	<i>Inativação térmica de diferentes preparações de Lecitase imobilizada.....</i>	168
8.3.6	<i>Hidrólise de fenilacetato de metila.....</i>	168
8.3.7	<i>Hidrólise de R e S mandelato de metilo.....</i>	169
8.3.8	<i>Ensaio de SDS-PAGE.....</i>	170
8.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	170
8.4.1	<i>Imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr.....</i>	170
8.4.2	<i>Efeito das modificações químicas sobre a atividade da enzima.....</i>	171
8.4.3	<i>Efeito do pH sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase.....</i>	173
8.4.4	<i>Efeito da presença de detergentes na atividade da enzima.....</i>	176
8.5	<i>Estabilidade Térmica.....</i>	184
8.4.6	<i>Especificidade das diferentes preparações.....</i>	187

8.4.7	<i>Enantio-especificidade das diferentes preparações.....</i>	192
8.5	CONCLUSÃO.....	192

Capítulo 9 – Recobrimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos visando à melhoria da sua capacidade catalítica.....

9.1	Resumo.....	194
	Palavras-chave.....	194
9.2	Introdução.....	195
9.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	197
9.3.1	Materiais.....	197
9.3.2	Determinação da atividade enzimática.....	197
9.3.3	Imobilização de Lecitase em octil agarose.....	198
9.3.4	Imobilização de Lecitase em CNBr agarose.....	198
9.3.5	Revestimento de imobilizada por Lecitase polímero iônico.....	198
9.3.6	Inativação térmica de diferentes preparações de Lecitase imobilizada.....	199
9.3.7	Inativação de diferentes preparações de Lecitase na presença de co-solvente orgânico.....	199
9.3.8	Hidrólise do hexanoato de etila.....	199
9.3.9	Hidrólise do fenilacetato de metila.....	200
9.3.10	Hidrólise de R e S mandelato de metilo.....	200
9.3.11	Inativação irreversível de Lecitase imobilizada na presença de D-pNP.....	201
9.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	201
9.4.1	Efeito do revestimento com DS e PEI na atividade de Lecitase Ultra imobilizada.....	201
9.4.2	Otimização do revestimento de Lecitase Ultra imobilizada com PEI.....	203
9.4.3	Estudo sobre as causas dos efeitos do tratamento PEI sobre a atividade da enzima.....	204
9.4.4	Caracterização dos derivados de Lecitase revestido com os polímeros.....	206
9.4.4.1	Efeito no perfil de atividade/pH.....	206
9.4.4.2	Estabilidade sob diferentes condições.....	207
9.4.4.3	Especificidade das diferentes preparações de Lecitase.....	209
9.5	CONCLUSÕES.....	212

	Capítulo 10 – Estabilização de estruturas hiperativada de Lecitase através da modificação física com polímeros iônicos.....	213
10.1	Resumo.....	214
	<i>Palavras-chave.....</i>	<i>214</i>
10.2	Introdução.....	215
10.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	217
10.3.1	<i>Materiais.....</i>	<i>217</i>
10.3.2	<i>Determinação da atividade enzimática.....</i>	<i>217</i>
10.3.3	<i>Imobilização de Lecitase em CNBr agarose.....</i>	<i>218</i>
10.3.4	<i>Revestimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos.....</i>	<i>218</i>
10.3.5	<i>Análise do efeito dos detergentes sobre a estabilidade de CNBr-Lecitase.....</i>	<i>218</i>
10.3.6	<i>Inativação irreversível de Lecitase imobilizada na presença de D-pNPP.....</i>	<i>219</i>
10.4	RESULTADOS	219
10.4.1	<i>Efeito do detergente nas propriedades da enzima.....</i>	<i>219</i>
10.4.2	<i>Efeito da incubação da enzima imobilizada na presença de polímeros e detergentes.....</i>	<i>221</i>
10.4.3	<i>Estudo da acessibilidade dos resíduos catalíticos de Ser.....</i>	<i>223</i>
10.4	CONCLUSÕES.....	225
11	CONCLUSÃO.....	226
12	REFERÊNCIAS.....	227
	ANEXOS.....	253
	<i>ANEXO A – Resumen de la tesis en castellano.....</i>	<i>254</i>
	<i>ANEXO B – Publicações.....</i>	<i>270</i>

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores de origem biológica com um alto potencial em diferentes áreas de aplicação da indústria, devido a sua alta seletividade, especificidade e atividade em condições brandas. Atualmente, as enzimas vêm alcançando altos níveis de aplicação em diversas áreas como a farmacêutica e química fina, na modificação de alimentos ou na produção de energia (por exemplo, biodiesel e bioetanol) (SCHMID, et al. 2001; COWAN e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; SHELDON e PELT, 2013; GUIBAN, 2013; RODRIGUES, et al. 2013; ROCHA et al. 2014).

Contudo, a imobilização de enzimas aparece como uma estratégia que pode aumentar a utilização em escala industrial. Uma vez que a imobilização permite fácil reutilização da enzima e simplifica o monitoramento, desenho e desempenho global dos biorreatores. Nesse sentido, muitos esforços têm sido dedicados para converter este requisito em uma ferramenta poderosa para melhorar o desempenho das enzimas, sua estabilidade, atividade, seletividade, redução de inibição, etc (GARCIA-GALAN, et al. 2011; RODRIGUES, et al. 2013; GUIBAN, 2013; BARBOSA, et al. 2013).

A imobilização de enzimas é utilizada para facilitar o controle dos biorreatores e, onde a enzima é suficientemente estável, a recuperação/reutilização do biocatalisador. Um protocolo de imobilização adequado deve proporcionar uma imobilização, suficientemente, forte, a fim de evitar a liberação da enzima, que pode contaminar o produto e resultar em perda de enzima ou atividade catalítica (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; SHELDON, 2007; GUIBAN, 2013).

Além disso, a imobilização e estabilidade estão estreitamente relacionadas, pois só biocatalisadores bastante estáveis poderiam ser reutilizados. Contudo, o termo "imobilização" não implica necessariamente a estabilização de uma enzima. Na verdade, se o protocolo de imobilização não está bem concebido, por exemplo, permitindo que as interações enzima-suporte não controladas, as enzimas imobilizadas podem ser ainda menos estáveis do que as enzimas livres (RODRIGUES, BERENGUER-MURCIA e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; MATEO, et al. 2007; ADRIANO, et al. 2005; PALOMO, et al. 2013).

Imobilizar enzimas, na maioria dos casos, irá produzir pequenas distorções em sua estrutura, e isto pode alterar as propriedades finais no biocatalisador. Essas alterações serão largamente não controladas, mas permitirá a construção de uma grande biblioteca de catalisadores obtidos seguindo diferentes processos de imobilização, o que pode favorecer a

melhora das propriedades de enzimas. Nesse contexto, a melhoria das propriedades das enzimas pode ser conseguida por diferentes estratégias, tais como microbiologia, a manipulação genética, a modificação química, imobilização, ou a combinação destas (MATEO, et al. 2007; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; BARBOSA, et al. 2014; GODOY, DE LAS RIVAS, GUISÁN, et al. 2014).

A modificação química das proteínas é uma ferramenta poderosa para modular as propriedades da enzima e também para modificar as propriedades físico-químicas da superfície da enzima (SANTOS et al. 2014). Esta estratégia tem sido utilizada em muitos casos, para aumentar a solubilidade das enzimas em alguns meios não convencionais (RODRIGUES, BERENGUER-MURCIA e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; GARCIA-GALAN, et al. 2014). Em outros casos, a modificação química é realizada para alterar a reatividade da enzima com diversos reagentes ou superfícies. A modificação química da superfície de uma enzima para produzir novos grupos, com reatividade melhorada. O que pode favorecer, sob condições mais suaves, uma modificação da superfície maciça da enzima (RODRIGUES, BERENGUER-MURCIA e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; GARCIA-GALAN, et al. 2014).

No entanto, a utilização de uma estratégia de modificação de enzimas em fase sólida pode simplificar muito o processo de modificação química de proteínas. A modificação química e imobilização de enzimas têm sido geralmente consideradas ferramentas não relacionadas para melhorar as características do biocatalisador. Contudo, há muitos exemplos em que uma enzima quimicamente modificada é finalmente utilizada sob a forma imobilizada, e que exemplifica como ambas as ferramentas podem ser complementares, resultando em um sinergismo entre os resultados finais (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; SANTOS et al. 2014; GARCIA-GALAN, et al. 2014).

No presente trabalho, será abordado o desenvolvimento de estratégias para modulação das propriedades de enzimas por técnicas físico-químicas, visando à produção de biocatalisadores enzimáticos estáveis. Serão discutidos protocolos desenvolvidos para melhoria e manutenção da eficiência catalítica após a imobilização de diferentes enzimas em diferentes suportes.

1.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste estudo foi à otimização de biocatalisadores enzimáticos através do desenvolvimento de estratégias para modulação das propriedades de enzimas por técnicas físico-químicas.

1.1.1 Objetivos específicos

- Caracterização de suporte agarose ativada com divinilsulfona para a estabilização de enzimas imobilizadas por ligação covalente multipontual;
- Desenvolvimento de protocolos para a imobilização/estabilização de enzimas em esferas de agarose ativada com divinilsulfona;
- Modulação de lipase imobilizadas em suporte ativado com divinilsulfona em diferentes condições;
- Modulação de lipase imobilizada alterando as propriedades físicas do suporte ativado com DVS; efeito do agente de bloqueio sobre as propriedades catalíticas;
- Modulação de lipase imobilizada por modificação química;
- Modulação de lipase imobilizada por modificação física com polímeros iônicos;
- Estabilização da forma aberta de lipases.

Capítulo 2

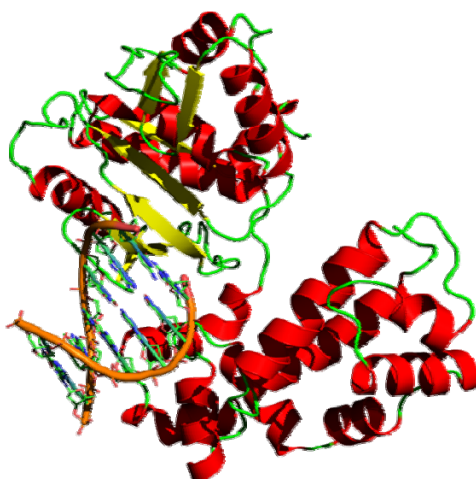
Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

As enzimas (Figura 2.1) são proteínas que atuam como catalisadores biológicos. Elas são biocompatíveis, biodegradáveis e derivadas a partir de recursos renováveis, como microrganismos, fungos e plantas. Devido às suas excelentes propriedades funcionais, as enzimas são capazes de catalisar os processos químicos mais complexos, nas condições experimentais e ambientais mais benignas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Figura 2.1 - Estrutura da enzima DNA polimerase β , EC 2.7.7.7, código *Protein Data Bank* (PDB):7ICG.



Fonte: (PELLETIER et al., 1996).

As enzimas apresentam uma série de características que tornam seu uso vantajoso em comparação com catalisadores químicos convencionais. O primeiro deles é um elevado nível de eficiência catalítica, muitas vezes, muito superior aos catalisadores químicos, e um grau elevado de especificidade que lhes permite discriminar não só entre as reações, mas também entre os substratos (especificidade de substrato), partes similares de moléculas (regioespecificidade) e entre isômeros ópticos (estereoespecificidade), (KRAJEWSKA, 2004).

Enzimas atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão atingindo velocidades da ordem de reação conseguida com catalisadores químicos, em condições

extremas de reações (KRAJEWSKA, 2004; SHELDON; VAN PELT, 2013). Essas características proporcionam uma redução no custo final do processo, com diminuição no consumo de energia e redução de subprodutos indesejáveis, consequência de sua elevada especificidade que proporciona um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis e diminuição da quantidade de resíduos. (GUISAN, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013).

A determinação do nome das enzimas é sistematizada por um comitê especializado, o *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB). As enzimas são classificadas em seis grandes grupos (Classes), de acordo com o tipo de reação que catalisam. Cada enzima descrita recebe um número de classificação, conhecido por “E.C.” (*Enzyme Commission of the NC-IUBMB*), que é composto por 4 dígitos (CORNISH-BOWDEN, 2014):

1. *Classe*
2. *Sub-classe dentro da classe*
3. *grupos químicos específicos que participam da reação.*
4. *a enzima, propriamente dita*

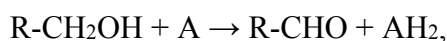
Por exemplo: Quimotripsina: E.C. 3.4.21.1

- 3 - *Classe = Hidrolase (catalisa reações de hidrólise de ligações covalentes)*
 4 - *Sub-Classe = Peptidase (hidrolisa ligações peptídicas)*
 21 - *Serino-endopeptidases (enzimas contendo serina no sítio ativo)*
 1 - *quimotripsina*

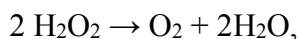
Dessa forma, segue a classificação de enzimas conhecidas, (SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG, 2014):

1) *E.C.1: Oxidorredutases:*

Estas enzimas catalisam reações do tipo redox, ou seja, as reações que envolvem a transferência de elétrons de uma molécula para outra. Em sistemas biológicos, muitas vezes, a remoção de átomos de hidrogênio a partir de um substrato. Essas enzimas são chamadas desidrogenases. Por exemplo, álcool desidrogenase catalisa reações do tipo:



em que A é uma molécula aceitadora de hidrogénio. Outros exemplos de oxidorredutases são oxidases e lacases, catalisando tanto a oxidação de vários substratos de dioxigênio e peroxidases, oxidações catalisadas por peróxido de hidrogénio. As enzimas catalases são um tipo especial, catalisando reação de auto oxirredução ou desproporcionamento:

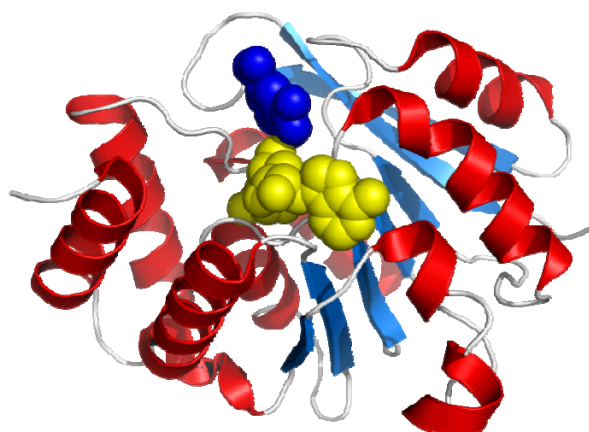


Tanto em que o peróxido de hidrogénio é oxidado e reduzido, ao mesmo tempo.

2) E.C.2: *Transferases*:

Enzimas nesta classe catalisam a transferência dos grupos de átomos de uma molécula para outra. Os tipos de enzimas mais comuns são aciltransferases e glicosiltransferases. CGTase (ciclodextrina glicosiltransferase) é um tipo de enzima, o qual move os resíduos de glicose dentro de cadeias de polissacáridos em uma reação que forma oligômeros cíclicos de glucose (ciclodextrinas). Por exemplo, a catecol-O-metiltransferase (COMT), Figura 2.2, uma enzima que degrada as catecolaminas como a dopamina, epinefrina e norepinefrina (GROSSMAN; EMANUEL; BUDARF, 1992).

Figura 2.2 - Estrutura da enzima COMT, código *Protein Data Bank* (PDB) 3BWM



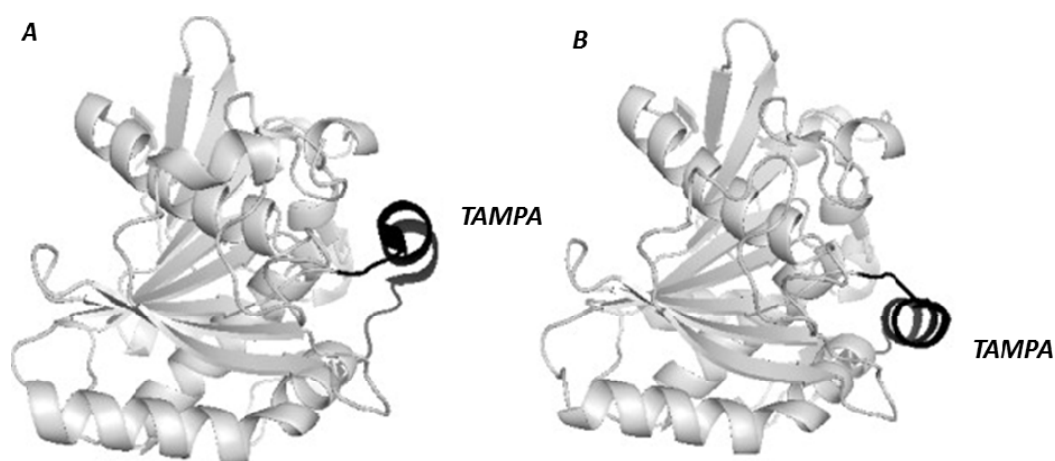
Fonte: (RUTHERFORD et al., 2008).

2) E.C.3: *Hidrolases*:

As enzimas hidrolases catalisam a hidrólise, ou seja, a clivagem de substratos em água. As reações incluem a clivagem das ligações peptídicas em proteínas por proteases, ligações glicosídicas em hidratos de carbono de uma grande variedade de hidratos de carbono, e de ligações éster nos lipídeos por lipases. Em geral, as moléculas maiores são quebradas em fragmentos menores por hidrolases.

As lipases, Figura 2.3, estão entre as enzimas mais utilizadas na tecnologia de enzima, porque reconhecem uma grande variedade de substratos e podem catalisar muitas reações diferentes, tais como a hidrólise ou para a síntese de ésteres de ligações, alcoólise, aminólise peroxidações, epoxidações e interesterificações. (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

Figura 2.3 - Estrutura da Lipase de *Rhizomucor miehei* (RML), em A: conformação aberta, código *Protein Data Bank* (PDB): 3TGL; em B conformação fechada, código *Protein Data Bank* (PDB): 4TGL.



Fonte: (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

A utilização destas enzimas como biocatalisadores industriais precisa considerar o seu mecanismo de ação peculiar. As lipases na natureza hidrolisam óleos e gorduras, que são encontrados como emulsões ou gotas. Para resolver esta situação, as lipases têm uma propriedade comum, em meio homogêneo, elas têm o seu centro ativo isolado do meio por uma cadeia de polipeptídeo chamada tampa ou aba. (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

Este mecanismo de ação é normalmente chamado de "ativação interfacial" das lipases, e as alterações conformacionais devem ser consideradas no uso destas enzimas como

biocatalisador. A extrema flexibilidade do centro ativo de lipases, as suas propriedades catalíticas podem ser facilmente alterados, sem inativação da enzima. Assim, as propriedades de lipase podem ser grandemente moduladas por pequenas mudanças nas condições de reação, mas também alterações dramáticas nas propriedades da enzima podem ser conseguidas por meio de diferentes protocolos de imobilização ou por sua composição química ou modificação física. (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

3) E.C.4: *Liases*:

Catalisam adição de grupos a ligações duplas, ou criação de ligações duplas pela retirada de grupos. Assim, as ligações são clivadas por um mecanismo diferente a partir de hidrólise. Liases de pectato, por exemplo, dividi as ligações glicosídicas na pectina em uma reação de eliminação deixando um resíduo ácido glucurônico com uma ligação dupla.

4) EC 5: *Isomerases*

Isomerases catalisam rearranjos dos átomos dentro da mesma molécula; por exemplo, a glicose isômera irá converter glicose em frutose.

5) E.C.6: *Ligases*

As ligases juntam moléculas com ligações covalentes em reações biossintéticas. Tais reações requerem o fornecimento de energia a partir da hidrólise de uma ligação concorrente difosfato de ATP, o que faz com que este tipo de enzima seja de difícil aplicação comercialmente.

2.2 Tecnologia enzimática

A evolução da bioengenharia têm levado a melhorias na estabilidade, economia, especificidade e potencial de aplicação global de enzimas industriais. Quando todos os benefícios do uso de enzimas são levados em consideração, não é de estranhar que o número de aplicações comerciais de enzimas está aumentando a cada ano (SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG, 2014).

A história da tecnologia enzimática começou em 1874, quando o químico dinamarquês Christian Hansen produziu o primeiro exemplar do coalho, extraído de estômagos de bezerros secos com uma solução salina, que foi a primeira enzima utilizada para fins industriais. Este evento significativo foi precedido por uma evolução longa. A digestão da carne pelas secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares pelos extratos vegetais e saliva eram conhecidos naquele tempo em si (BINOD et al., 2013).

A atividade fermentativa dos microrganismos foi descoberta no século 18 pelo cientista francês Louis Pasteur. Em 1878, o fisiologista alemão Wilhelm Kühne (1837-1900) criou o termo enzima da palavra em Latim, que significa literalmente "na levedura". Em 1897, Eduard Buchner começou a estudar a capacidade dos extratos de fermento que faltaram todas as células vivas de levedura para fermentar o açúcar. Em uma série de experimentos na Universidade de Berlim, ele descobriu que o açúcar foi fermentado mesmo quando não havia células vivas de levedura na mistura. Nomeou a enzima que causou a fermentação da sacarose "zymase" (BINOD et al., 2013).

A primeira aplicação de enzimas celulares livre ocorreu com a utilização de protease renina aspártico isolada do estômago de bezerro ou cordeiro durante a fabricação de queijos. A primeira enzima comercial (tripsina) foi preparada pelo Rohm, na Alemanha, em 1914; isolado a partir de animais e utilizado em detergente para degradar proteínas (BINOD et al., 2013; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

A introdução de proteases microbianas em pós de lavagem fez uma verdadeira inovação em indústrias de detergentes. O primeiro *Bacillus* protease bacteriana comercial foi comercializado em 1959 e se tornou um grande negócio quando Novozymes na Dinamarca começou a fabricá-lo e grandes fabricantes de detergentes começaram a usá-la em torno de 1965 (BINOD et al., 2013; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

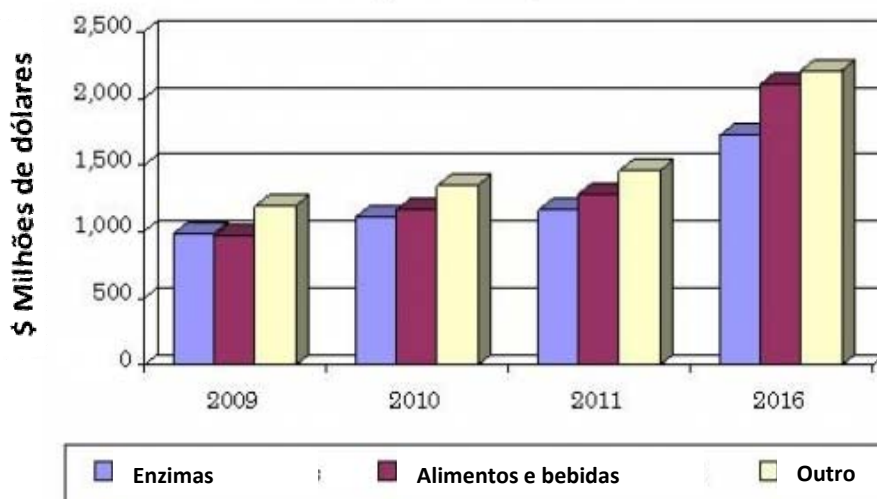
As enzimas foram usadas em 1930 na fabricação de suco de frutas. Uma maior utilização iniciou-se a partir de 1960 na indústria de amido. A hidrólise ácida tradicional de amido foi completamente substituída pelo alfa-amilases e glucoamilases, que podem converter o amido com mais de 95%, o rendimento em glucose. Indústria de amido se tornou o segundo maior consumidor de enzimas após a indústria de detergente (BINOD et al., 2013; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

O uso de enzimas resulta em muitas vantagens, como uma maior qualidade do produto, custo de fabricação mais baixo e menos desperdício, e consumo reduzido de energia. Os tratamentos químicos mais tradicionais ainda produzem efeitos colaterais indesejáveis e/ou

problemas de eliminação de resíduos. O grau em que um efeito técnico desejado é conseguido por uma enzima pode ser controlado através de diversos meios, tais como a dosagem, temperatura e tempo. Porque as enzimas são catalisadores, a quantidade adicionada para realizar uma reação é relativamente pequena. As enzimas utilizadas no processamento de alimentos são geralmente destruídas durante os passos de processamento subsequentes e não está presente no produto final alimentar (BINOD et al., 2013; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

A Biotecnologia está ganhando terreno rapidamente, pois oferece várias vantagens em relação às tecnologias convencionais. A projeção do mercado mundial de enzima industrial até a presente data é mostrado na Figura 2.4, onde segundo os dados apresentados, o mercado mundial de enzimas industriais foi avaliado em US\$3,1bilhões em 2009 e chegou a cerca de US \$ 3,6 bilhões em 2010. O mercado estimado para 2011 foi cerca de US \$ 3,9 bilhões. As projeções é que este mercado cresça a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 9,1% para chegar a US\$6 bilhões até 2016 (“Global Markets for Enzymes in Industrial Applications - BIO030H,” 2014).

Figura 2.4 - Mercado global de enzimas industriais, 2009-2016.



Fonte: (“Global Markets for Enzymes in Industrial Applications - BIO030H,” 2014).

Comida e bebida por enzimas compõem o maior segmento da indústria de enzimas industriais, com faturamento de cerca de US \$ 1,2 bilhão em 2010. Este mercado deve chegar tinha expectativa de chegar a 1,3 bilhões dólares em 2011, com proporção de crescimento e ainda mais ele vai crescer para US\$ 2,1 bilhões em 2016, um CAGR de 10,4%.

A segunda maior categoria é de enzimas técnicas com uma receita de cerca de US \$ 1,1 bilhão em 2010 e cerca de US \$ 1,2 bilhão em 2011. Este mercado ainda deverá crescer para US \$ 1,7 bilhões em 2016, um crescimento anual de 8,2%. As maiores vendas de enzimas técnicas ocorrem no mercado de couro, seguido por o mercado de bioetanol (“Global Markets for Enzymes in Industrial Applications - BIO030H,” 2014).

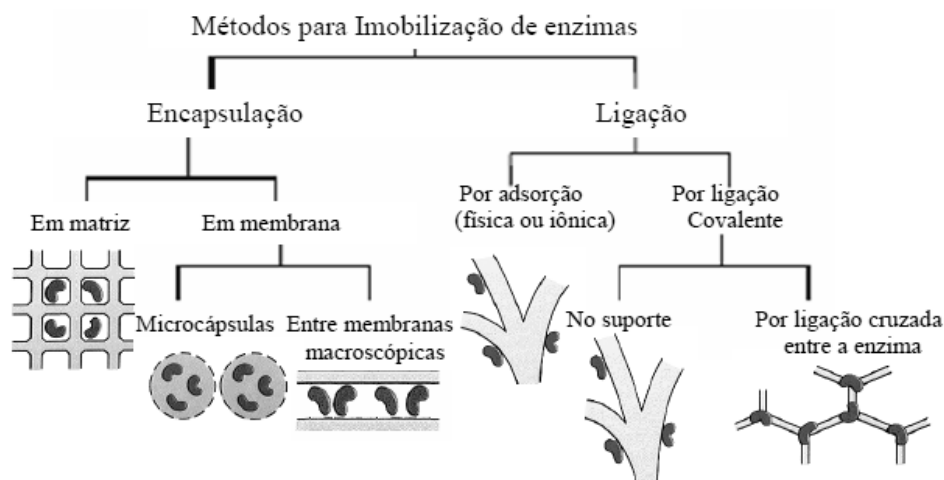
A segmentação de mercado para diversas áreas de aplicação mostra que 34% do mercado são para alimentos e rações animais seguido de detergente e produtos de limpeza (29%). Celulose e papel com participação de 11% do mercado, enquanto 17% do mercado são capturados por indústrias têxteis, couro e peles (“Global Markets for Enzymes in Industrial Applications - BIO030H,” 2014).

Apesar de apresentar muitas vantagens, a aplicação industrial de enzimas é frequentemente prejudicada pela falta de estabilidade operacional em longo prazo e de difícil recuperação e reutilização da enzima. Estes inconvenientes podem, geralmente, ser superado pela imobilização da enzima. (GARCIA-GALAN et al., 2011a; SHELDON, 2007).

2.3 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas é um requisito para a sua utilização como biocatalisadores industriais na maioria dos casos, uma vez que permite a imobilização simples, reutilização da enzima e simplifica o controle geral do desenho e do desempenho dos biorreatores. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009).

Os métodos de imobilização, Figura 2.5, mais utilizados fazem uso de adsorção ou ligação covalente da enzima a um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento em membrana polimérica em micelas reversas. Convencionalmente, enzimas são imobilizadas em matrizes sólidas, embora sejam também utilizados alguns polímeros que podem ser solúveis ou insolúveis dependendo do pH, temperatura ou a adição de espécies químicas. (VILLENEUVE et al., 2000).

Figura 2.5 - Métodos de imobilização de enzimas

Fonte: (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A escolha do método de imobilização é feita pela avaliação de parâmetros como atividade enzimática global, efetividade de utilização de lipase, desativação e características de regeneração, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas da enzima imobilizada ao suporte. (GUISAN, 2013).

Além de aumentar a estabilidade da enzima, a imobilização pode também melhorar significativamente outras propriedades das enzimas, devido à rigidificação da proteína, alteração do ambiente enzimático, bloqueio de alguns bolsões ou a distorção estrutural que ele pode produzir (GUISAN, 2013).

Entre as características melhoradas das enzimas após a imobilização, destacam-se as seguintes: (i) aumento da enantioespecificidade ou regioseletividade (por exemplo, as lipases ou penicilina G acilase (ROCCHIETTI et al., 2002); (ii) um melhor desempenho na síntese cineticamente controlada (por exemplo, penicilina G-acilase (VOLPATO; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010) ou β -galactosidase (PESSELA et al., 2007)); (iii) inibição reduzida (por exemplo, β -galactosidase, proteases, ou nitrílico hidrolases (PESSELA et al., 2003); (iv) menor modificação química por subprodutos reativos (por exemplo, causadas por peróxido de hidrogênio (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011b); e (v) a melhoria da reativação da enzima. (RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

A imobilização é uma tecnologia que permite que, para além de proporcionar um biocatalisador ativo e estável, deve ser uma operação relativamente simples sem necessidade de uma preparação de enzima de elevada pureza ou de um suporte de alto que pode não estar disponível comercialmente (SHELDON; VAN PELT, 2013). Dessa forma, uma imobilização adequada pode ser um instrumento extremamente útil e poderoso para melhorar custo o desempenho da enzima. No entanto, deve ser considerado que todas as estratégias para estabilizar uma enzima (como a modificação química de proteínas) são compatíveis, e que elas não devem ser consideradas como competidoras (RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

2.4 Suportes para imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas ou de proteínas é um requisito para suas aplicações como biocatalisadores. As propriedades de um biocatalisador são regidas pelas características tanto da enzima como do suporte (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). A interação enzima/suporte fornece um derivado com específicas propriedades cinéticas, químicas, bioquímica e mecânica. O suporte para imobilização pode ser um polímero orgânico sintético, um biopolímero ou um sólido inorgânico. (SHELDON; VAN PELT, 2013).

2.4.1 Resinas acrílicas

As resinas acrílicas são polímeros orgânicos sintéticos. Diversas resinas acrílicas porosas, tais como Amberlite XAD-7, são usados para imobilizar enzimas através de adsorção simples. Por exemplo, a enzima amplamente usada *C. antárctica* lipase B (Calb), encontra-se comercialmente disponível na forma imobilizada, como a Novozym 435 que consiste na enzima adsorvida numa resina acrílica macroporosa (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Uma desvantagem de imobilização deste modo é que, uma vez que não está ligada de forma covalente, a enzima pode ser lixiviado a partir do suporte de um meio aquoso, ou na presença de substratos e/ou produtos com propriedades tensoativas (SHELDON; VAN PELT, 2013). A ligação covalente em resinas acrílicas, tais como Eupergits C, um copolímero macro poroso (polímero acrílico com superfície epóxi-funcionalizado), é amplamente utilizado para

a imobilização de enzimas, além de contribuir para suprimir a lixiviação enzimática (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000).

Eupergit C é altamente hidrofílico e estável, quimicamente e mecanicamente, ao longo de um intervalo de pH de 0 a 14, e não aumenta de volume ou encolhimento mesmo em mudanças drásticas nesta faixa de pH. O tamanho médio da partícula é de 170 nm e o diâmetro dos poros é de 25 nm. Proteína de ligação envolve a reação de porções de superfície de oxirano com os grupos amino livres da enzima de modo a formar ligações covalentes, que possuem uma estabilidade de longo prazo durante um intervalo de pH de pH 1 a 12.

Os restantes grupos epóxi podem ser extintos com uma variedade de reagentes, tais como o mercaptoetanol, etanolamina e glicina. Devido à elevada densidade de grupos oxirano sobre a superfície do suporte as enzimas são imobilizadas em vários locais na sua superfície. Esta ligação multipontual é a grande responsável pela alta estabilidade operacional de enzimas imobilizadas em Eupergits (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000; SHELDON; VAN PELT, 2013).

2.4.2 Polímeros naturais

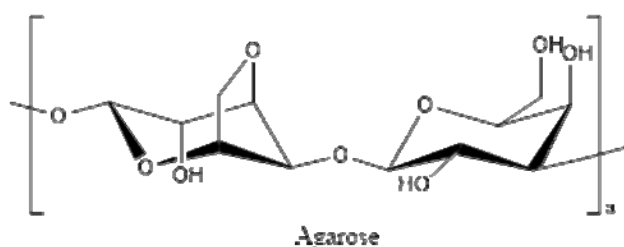
Uma variedade de polímeros que ocorrem naturalmente, polissacáridos essencialmente insolúveis em água, tais como celulose, amido, agarose e quitosana e proteínas tais como gelatina e albumina têm sido amplamente utilizadas como suportes para a imobilização de enzimas. (KRAJEWSKA, 2004).

Nesse contexto, Silva et al, 2012, relatam em seus estudos a imobilização por ligação covalente da enzima *Candida antarctica* lipase B em quitosana e no complexo quitosana-alginato ativada anteriormente por diferentes estratégias. Várias estratégias de ativação do suporte para imobilização da enzima foram realizadas e os melhores derivados mostraram atividades de $422,44 \pm 50,4$ e $378,30 \pm 34,70$ U/g de suporte para quitosana e do complexo quitosana-alginato, respectivamente, em comparação com a lipase imobilizada comercial Novozymes 435 ($529,78 \pm 11,7$ U/ g de suporte) a atividade foi um pouco menor. Os melhores derivados (lipase imobilizada em quitosana e em quitosana-alginato) foram utilizados na síntese de oleato de butila, obtendo-se uma conversão de 100% em 12hs de reação. (SILVA et al., 2012).

2.4.2.1 Agarose como suporte para imobilização de enzimas

Vários procedimentos têm sido empregados para alcançar a estabilização de enzimas, incluindo a engenharia genética. No entanto, a imobilização de enzimas, em suporte sólido poroso (sílica, alumina, vidro, agarose e celulose) por diferentes métodos (covalente e ligação iônica ou adsorção física) é provavelmente a estratégia mais utilizada para insolubilizar e melhorar a estabilidade de enzimas (GRAZU et al., 2006; GUISAN, 2013; MATEO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2013; TARDIOLI; ZANIN; DE MORAES, 2006).

Figura 2.6 – Estrutura química da agarose.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A agarose é um hidrocolóide linear purificado e isolado a partir de algas marinhas. Estruturalmente, é um polímero linear constituído por unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose, Figura 2.6. Neste sentido, as esferas de agarose ativadas com grupamentos glioxil foram com sucesso empregado para a imobilização-estabilização de muitas diferentes enzimas, resultando em altos fatores de estabilização e de alta preservação de atividades enzimáticas (BETANCOR et al., 2006; BLANCO; CALVETE; GUISÁN, 1989; BOLIVAR et al., 2006; GRAZU et al., 2006; GUISAN, 2013; GUISÁN, 1988; MATEO et al., 2006; MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2014; PEDROCHE et al., 2002; TARDIOLI; ZANIN; DE MORAES, 2006).

A primeira imobilização neste suporte é um processo multipontual, o que implica a área com a maior densidade de lisina resídua mais do que a área em que a resíduo mais reativo, como, por exemplo, a do grupo amino terminal) é colocado. Após a imobilização reação, por reação de agarose ativado com a enzima, uma a redução com boro-hidreto de sódio é geralmente realizada a fim para se obter títulos amino secundários muito estáveis e

para transformar a grupos aldeído residual no suporte em muito hidrofílico e grupos hidroxilo inertes. Assim, as moléculas com apenas uma grupo amino que não reagem significativamente com glioxil-agarose. (GUISAN, 2013; MATEO et al., 2006).

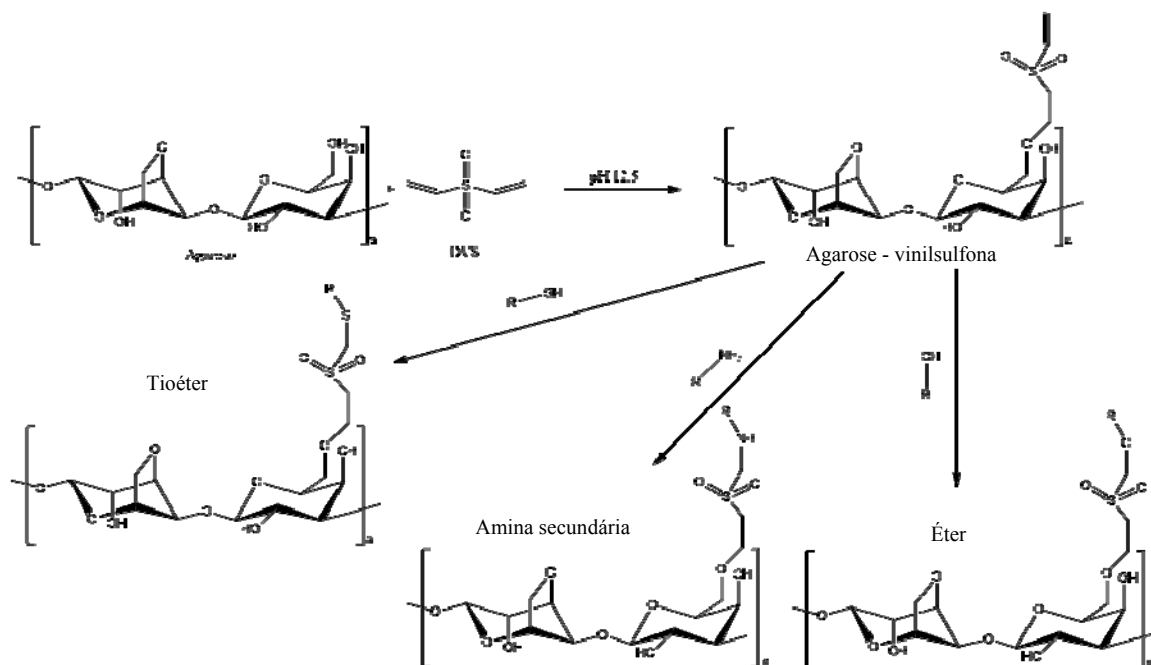
Uma variável com um grande interesse é a congruência geométrica entre enzima e suporte. Tem sido sugerido que quanto maior for a congruência enzima-suporte, maiores serão as possibilidades para conseguir uma ligação intensa multiponto. No caso de esferas de agarose, que são formadas por uma associação não covalente entre polímeros de agarose formando troncos de diâmetro relacionados com a concentração de agarose. Maior a concentração da agarose durante gelificação, mais espessa a agarose troncos formados, e à primeira vista, mais elevados às possibilidades de alcançar uma intensa ligação covalente multipontual. (GARCIA-GALAN et al., 2011a; GUISAN, 2013; GUISÁN, 1988; MATEO et al., 2006; PEDROCHE et al., 2002).

2.4.2.2 Ativação do suporte para imobilização de enzimas

As biomoléculas podem ser imobilizadas por vista hidrofóbica ou interações iônicas. No entanto, a imobilização covalente é necessária quando a biomolécula é adsorvida fracamente reduzida à adsorção não específica, ou quando e/ou a sua estabilidade em longo prazo são visadas. Em geral, a eficiência da imobilização em termos de rendimento e a estabilidade são melhoradas por meio de um passo de pré-ativação/funcionalização do suporte. (ORTEGA-MUÑOZ et al., 2010; WONG; KHAN; MICKLEFIELD, 2009).

Uma abordagem alternativa baseia-se na pré-ativação do suporte para promover a formação de uma ligação covalente entre a biomolécula e o suporte sólido. Esta estratégia baseia-se na reatividade dos grupos funcionais presentes naturalmente em biomoléculas (isto é, amina, tiol e hidroxilo, Figura 2.7) no sentido das derivatizações clássicas, tais como o método da base de Schiff (aminação redutiva), o método com N-Hidroxisuccinimida (NHS), o método com carbonildiimidazol (CDI), o método com epóxi (bis-oxirano), o método com 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), e o método com maleimida ou método hidrazida (ORTEGA-MUÑOZ et al., 2010).

Figura 2.7 - Mecanismo reacional de ativação da agarose com divinilsulfona (DVS) em pH alcalino, seguida da formação do complexo agarose-vinilsulfona. O mecanismo apresenta também as possibilidades de reação do suporte ativado com grupamentos presentes na superfície das enzimas, por exemplo, grupos amino, tiol e/ou hidroxilo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar da abundância de grupos funcionais nas biomoléculas, elas podem realizar ligações aleatórias, as principais vantagens deste método são: (i) o alcance é mais amplo, uma vez que não é limitado às proteínas recombinantes; (ii) a biomolécula não precisa ser modificado por demoradas manipulações químicas ou biológicas que podem alterar a sua função biológica; e (iii) Esta abordagem é flexível, uma vez que virtualmente qualquer biomolécula pode ser imobilizada sem necessidade de concepção de protocolos específicos, antes da obtenção/purificação (ORTEGA-MUÑOZ et al., 2010).

Suportes comerciais pré-ativados de agarose e derivados de poliestireno e, em menor grau, as sílicas comercialmente disponíveis são funcionalizados, embora a sua aplicação para a imobilização de biomoléculas nem sempre é simples e compatível com a natureza biológica das biomoléculas. (ORTEGA-MUÑOZ et al., 2010; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Ortega-Muñoz (2010) relatam em seu trabalho a combinação de sílica como suporte, pré-ativada com DVS produzindo um suporte que reage rapidamente para formar ligações covalentes, com os grupos amino e tiol que ocorre naturalmente em biomoléculas em condições suaves compatíveis com a natureza biológica de enzimas. Em seus relatos a enzima invertase (b-frutofuranosidase [EC3.2.1.26]) foi imobilizada nesse suporte. Os resultados alcançados mostram um rendimento de 50% de imobilização ao final de 24h foram conseguidos (ORTEGA-MUÑOZ et al., 2010).

Um método para a imobilização da lipase de *Candida rugosa* em de esferas de quitosana, por ativação dos grupos hidroxilo, presentes na superfície desse suporte, usando agente de acoplamento carbodiimida foi desenvolvido com sucesso por Shao-Hua Chiou, Wen-Teng Wu, 2004. A imobilização melhorou a estabilidade da enzima contra alterações de pH e temperatura. Foram observados uma alta estabilidade de armazenamento de 30 dias e uma atividade da enzima aumentada de 2,110% na lipase imobilizada. A lipase imobilizada utilizando esferas de quitosana manteve 78% entre 85% de sua atividade inicial após 10 ciclos de atividade (CHIOU; WU, 2004).

2.4.3 Polímeros inorgânicos

Uma variedade de suportes inorgânicos são utilizados para a imobilização de enzimas, por exemplo, de sílica, zeólitas, sílicas mesoporosas, tais como MCM-41, e SBA-15. Um dos métodos mais simples e barato para imobilizar uma enzima, além disso, a superfície desses materiais pode ser determinada comparando a imobilização do material calcinado e não calcinado. Se estes valores são mais ou menos os mesmos, isso sugere que, a maior parte da enzima está na superfície exterior do suporte, enquanto que quando o material calcinado absorve muito mais enzima, isso indica que a maior parte da enzima reside nos poros. (DÍAZ; BALKUS, 1996; PETRI; MARCONCINI; SALVADORI, 2005; SHELDON; VAN PELT, 2013; ZHOU; HARTMANN, 2012).

A imobilização covalente de α -quimotripsina (EC 3.4.21.2), a um suporte inorgânico sol-gel de vidro, que tinha sido modificado por reação de grupos hidroxilo na superfície desse material, com 3,3,3-trimethoxypropanal, obteve-se um catalisador imobilizado com uma meia-vida de mil vezes que da enzima solúvel (WANG et al., 2010a). Similarmente, a imobilização de lipase de *Mucor javanicus* (EC 3.1.1.3) em nano partículas

de sílica funcionalizadas resultou em estabilidade térmica melhorada e uma elevada retenção da atividade ao longo de um pH mais (HONG et al., 2007).

2.4.4 Imobilizações em nano partículas magnéticas

Enzimas podem ser imobilizadas, em nano partículas magnéticas funcionalizadas (MNPs) que podem ser separados a partir da mistura de reação por decantação magnético ou utilizados em leito fluidizado estabilizado magneticamente reatores. As MNPs funcionalizadas tornaram-se disponíveis comercialmente na última década impulsionado por vários biomédica e biotecnológicas. Elas consistem de um núcleo de óxido de ferro (Fe_3O_4), revestida com, por exemplo, sílica que contém amina pendente ou porções carbóxilo. Este último pode ser utilizado para ligar à enzima a MNP. (YIU; KEANE, 2012).

Nano compósitos mesoporosos de sílica- Fe_3O_4 funcionalizados com aldeído, foram investigados como os suportes para imobilização covalente da penicilina G acilase (PGA), por Yang et. Al, 2014. Os resultados mostraram que as nano partículas de Fe_3O_4 paramagnéticas foram encaixados entre as camadas de sílica mesoporosa e os grupos aldeído foram condensados sobre a superfície de sílica mesoporosa.

A PGA foi covalentemente imobilizada sobre estes nano compósitos paramagnéticos através da reação para produzir bases de Schiff entre os grupos amino livres de resíduos de lisina da PGA e os grupos aldeído na superfície destes nano compósitos. A PGA imobilizada nesses nano compósitos paramagnéticos tinham melhor estabilidade operacional e foi facilmente reciclada por um campo magnético externo. A PGA imobilizada tinha a atividade inicial de 6231 g L^{-1} e a estabilidade operacional de 91,0% da atividade inicial depois de reciclado por 10 vezes (YANG et al., 2014).

2.5 Modificação Química de Enzimas

A modificação química das proteínas é uma ferramenta poderosa para modular as propriedades enzimáticas e também para modificar as propriedades físico-químicas da superfície da enzimática (GARCIA-GALAN et al., 2014). A Tabela 2.1 apresenta aplicação recente da modificação por técnicas físico-químicas sobre enzimas.

Esta estratégia tem sido utilizada em muitos casos, para aumentar a solubilidade das enzimas em alguns meios não convencionais; por exemplo, a hidrofobização de superfície

a enzima pode produzir um composto enzimática que era solúvel em meios orgânicos. Em outros casos, a modificação química é realizada para alterar a reatividade da enzimática com diversos reagentes ou superfícies (RUIZ et al., 2013).

Tabela 2.1 – Modificação físico-químicas de enzimas.

Enzima	Agente modificante	Referência
Lecitase Ultra	Etilenodiamina (EDA), glutaraldeído ou ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS)	(GARCIA-GALAN et al., 2014)
Lecitase Ultra	Dextrano sulfato (DS) ou polietilenimina (PEI)	(SANTOS et al., 2014)
Lecitase Ultra	Polietilenimina (PEI), dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	(DOS SANTOS et al., 2014)
Glutamato desidrogenase	Polietilenimina (PEI)	(GARCIA-GALAN; BARBOSA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2013)
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Etilenodiamina (EDA) ou Polietilenoglicol (PEG)	(RUIZ et al., 2013)
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Etilenodiamina (EDA) ou Glutaraldeído	(GALVIS et al., 2012c)
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Glutaraldeído	(BARBOSA et al., 2012d)
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Glutaraldeído ou ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS)	(BARBOSA et al., 2012a)
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Etilenodiamina (EDA)	(GALVIS et al., 2012a)
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Formaldeído, etilenodiamina (EDA) ou ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS)	(RODRIGUES et al., 2009)
Novozym-435	Polímeros iônicos, etilenodiamina (EDA), 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) ou etanolamina	(CABRERA et al., 2009)
Lipase de <i>Bacillus thermocatenuatus</i>	Etilenodiamina (EDA)	(FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008)

Fonte: Elaborada pelo autor.

A modificação química das enzimas deve ser considerada como um passo adicional. Isto significa que as melhorias causadas por modificação química precisam compensar os custos necessários para realizar a operação. Além disso, a modificação genética hoje em dia é quase uma técnica de laboratório padrão que se desloca lentamente, a

modificação química. Assim, apesar do seu potencial para melhorar as propriedades enzimáticas, a modificação química não é tão popular como a imobilização (RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; RODRIGUES et al., 2013).

A modificação química de uma enzima pode exercer a modificação dos principais grupos da enzima (por exemplo, grupos quimicamente sensíveis, grupos situados em regiões-chave, etc.). De fato, a modificação química específica dos grupos no sítio ativo é uma técnica comum para identificar os grupos envolvidos. (RODRIGUES et al., 2013).

A modificação química de uma superfície geral da enzima para produzir novos grupos com reatividade melhorada contra qualquer modificador pretendido pode ajudar a produzir uma modificação de superfície maciça da enzima, sob condições mais suaves. No entanto, uma modificação química de duas vezes a enzima pode perder tempo e também produz graves diminuições na atividade da enzima. (RUIZ et al., 2013).

No entanto, a utilização de uma estratégia de modificação em fase sólida pode simplificar muito o processo de modificação química de proteína (GALVIS et al., 2012b). Recentemente, alguns exemplos que mostram a aminação de lipases com etilenodiamina depois da sua imobilização em octil-Sepharose foram relatados, mostrando que a atividade e estabilidade são geralmente mantidos (ou mesmo aumentada sob certas condições e substratos), e propriedades da enzima pode ainda ser modulada através desta aminação (RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

O etilenodiamina de proteínas tem sido relatado há muito tempo e é simples chegar a um controle bastante rigoroso (controlando a concentração -carbodiimida ou pH de reação)(RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). A modificação de Tyr é uma reação lateral que pode ser facilmente revertida por incubação da enzima modificada com um nucleófilo como hidroxilamina.

O grupo amino primário recentemente introduzido tem um valor de pK de 9,2, maior do que o pKa do grupo amino terminal da proteína (ou seja entre 7 e 8, dependendo do meio ambiente e da natureza do grupo), mas muito mais baixa do que o pK do ϵ -amino de Lys grupos externos (que é mais de 10,5). Desta forma, uma grande modificação da enzima com succínico PEG pode ser facilitada tantos grupos com um pKa mais favorável pode ser introduzido na superfície da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993).

Em geral, os efeitos de uma modificação química nas propriedades da enzima podem ser complexos para prever, e muito provavelmente, os efeitos positivos serão limitados a certas condições experimentais. (MOSSAVARALI et al., 2006).

2.6 Modificação em fase sólida de enzimas com polímeros

A utilização de polímeros para modificar uma enzima parece complexa, devido ao grande tamanho do polímero que irá afetar a superfície de uma maneira global. No entanto, existem enzimas cuja função catalítica exige drásticas mudanças conformacionais que afetam a área específica de superfície das proteínas e, um polímero acoplado a estas regiões podem alterar grandemente a propriedades enzimáticas (GARCIA-GALAN et al., 2011a).

Lipases estão entre as enzimas mais interessantes em biocatálise, e em muitos casos, têm sido objeto de modificações com polímeros iônicos para melhorar a sua solubilidade em meio orgânico. No entanto, o mecanismo de ação das lipases, envolvendo grande mobilidade no centro proximidade ativa devido ao seu mecanismo de ativação interfacial, significa que qualquer modificação de lipases pode alterar significativamente as suas propriedades finais. Assim, há muitos exemplos de alterações das propriedades lipase por, a modificação química, engenharia de médio ou manipulação genética. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011a; MATEO et al., 2007; PALOMO et al., 2007; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b).

Neste sentido, a modificação química da enzima com polímeros iônicos, ou polímero hidrófobo, não só pode melhorar a solubilidade da enzima em meios orgânicos, mas também podem alterar a mobilidade da estrutura da enzima (em função do tamanho volumoso do modificador) e conformação (por alteração das interações na superfície da enzima), assim, as propriedades, das enzimas catalíticas.

Esta modulação de lipases utilizando diferentes modificadores químicos já foi demonstrada; mesmo uma modificação dirigida ao local com PEG de uma lipase por engenharia genética a partir de *Bacillus thermocathenolatus* foi realizada. Os efeitos de modificação química nas propriedades enzimáticas têm sido referidos como sendo dependente do protocolo de imobilização (BARBOSA et al., 2012b; PALOMO et al., 2007).

Capítulo 3

Caracterização de suportes ativados com divinilsulfona como uma ferramenta para imobilizar e estabilizar enzimas via ligação covalente multipontual. Aplicação para quimotripsina

3.1 Resumo

A Lecitase Ultra, uma fosfolipase quimérica comercializada pela Novozyme, foi imobilizada por meio de duas estratégias diferentes: ligação covalente em brometo de cianogênio-agarose e ativação interfacial em octil-agarose. Posteriormente, as preparações imobilizadas foram submetidas a modificações químicas diferentes (aminação, glutaraldeído ou ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS)), a fim de se verificar o efeito destas modificações nas características catalíticas das enzimas imobilizadas, incluindo assim a estabilidade e especificidade para o substrato em diferentes condições. Pode-se afirmar que a imobilização afeta fortemente as características catalíticas das enzimas: já que octil-Lecitase foi mais ativo contra p-nitrofenilbutirato (p-NPB), mas se apresentou menos ativo frente a fenilacetato de metila que as preparações covalentes. Contudo, os efeitos das modificações químicas dependem fortemente da estratégia de imobilização usada. Por exemplo, o uso de um protocolo de imobilização para duas enzimas promoveu um efeito positivo na atividade, enquanto que para a outra enzima foi negativo. A maior parte das modificações apresentou um efeito positivo nas propriedades da enzima, sob certas condições, embora em certos casos, a modificação apresentou um efeito negativo sob outras condições. Por exemplo, a modificação com glutaraldeído da enzima imobilizada ou modificada e aminada, permitiu melhorar a estabilidade da enzima de ambas as preparações imobilizadas, a pH 7 e 9 (em torno de uma 10 vezes), mas apenas a enzima aminada apresentou melhora na estabilidade em pH 5. Apesar de alguma reticulação intermolecular ter sido detectada por meio de SDS-PAGE, a aaminação melhorou a estabilidade de octil-Lecitase, ao mesmo tempo em que reduziu a estabilidade da preparação covalente. A modificação com TNBS só melhorou a estabilidade da enzima da preparação covalente a um pH 9 (por um fator de 10 vezes menor).

Palavras-chave: Imobilização de enzimas. Modificação química de enzima. Estabilização de enzima. Hiperativação de enzima. Glutaraldeído. Ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico.

3.2 Introdução

A imobilização é, em muitos casos, um passo obrigatório na concepção de um biocatalisador, como é a solução mais simples para os problemas gerados por a solubilidade das proteínas em meio aquoso, permitindo a recuperação da enzima e sua separação do meio reacional []. A imobilização também simplifica o desenho de biorreatores e o controle da reação[].

Assim, muitos investigadores focaram os seus esforços na utilização do "obrigatório" passo de imobilização para melhorar as propriedades de outras enzimas, principalmente, a estabilidade da enzima [], mas também a atividade, seletividade ou especificidade [].

A estabilização de enzimas através de imobilização pode ser alcançada através de fenômenos diferentes. Qualquer molécula de enzima que é imobilizada dentro de um suporte poroso não podem sofrer qualquer processo de inativação intermoleculares (como precipitação, a proteólise, a interação com interfaces externas hidrofóbicos) []. Além disso, um sistema de imobilização adequada pode permitir melhorar a estabilidade da enzima por meio da geração de um ambiente enzimático favorável[], ao evitar a dissociação da subunidade de proteínas multiméricas [] ou através do aumento da rigidez da enzima através de ligação covalente multiponto [].

A ligação covalente multipontual, revelou-se como uma das ferramentas mais potentes para melhorar a estabilidade da enzima []. A escolha do suporte, as condições de imobilização e os grupos reativos na enzima e suporte são os pontos mais importantes na elaboração de biocatalisadores de enzimas estabilizadas através de ligação covalente multipontual [].

O suporte deve oferecer superfícies planas para a reação com a enzima (por exemplo, agarose) e deve apresentar diversos grupos reativos na superfície []. As condições de imobilização devem favorecer a mobilidade da enzima e da reatividade dos suportes e os grupos de enzimas (temperaturas moderadas, valores de pH alcalino, os tempos de reacção longos) []. Finalmente, o grupo reactivo com as necessidades de apoio para ser capaz de reagir com porções de enzimas que são geralmente abundantes na superfície da enzima. Além disso, ele deve oferecer impedimentos estéricos baixas para a reacção com os grupos de enzimas, boa estabilidade sob condições de imobilização e ser colocado a uma distância moderada da superfície de suporte de realmente transmitir a rigidez do suporte para a enzima []. O número

de grupos de suporte adequados para este objectivo não é muito elevado. Glioxilo [], epoxídica [] eo glutaraldeído versátil [] suportes ativados têm oferecido bons resultados neste tópico. No entanto, cada um destes grupos activos tem alguns problemas para o uso industrial. Glioxilo suportes têm sido descritos como muito adequado para obter uma intensa ligação covalente multiponto. Isto ocorre mesmo bom resultado, embora a imobilização sobre este suporte envolve apenas os grupos amino primários da proteína []. No entanto, a imobilização precisa ser realizado a valores de pH alcalino, com proteínas de baixa densidade de Lys pode até mesmo não ser imobilizado e o ponto final da reacção requer a utilização de boro-hidreto []. Epoxi-suportes podem reagir com uma vasta gama de grupos proteicos (amino, tiol, fenol, imidazol, carboxi) [], mas eles têm muito baixa reactividade, tornando-se necessária uma primeira adsorção da enzima sobre o suporte, mesmo para obter uma primeira covalente imobilização [] (isso tem sido útil para desenvolver suportes heterofuncionais epóxi) []. Devido a esta baixa reatividade, uma intensa ligação covalente multiponto é difícil de alcançar []. Glutaraldeído activada suportes têm baixa estabilidade, e muito baixa a pH alcalino [], geralmente os melhores resultados são alcançados por enzimas modificadoras anionicamente trocados sobre suportes amino (e que nem sempre é positiva para a actividade da enzima, pois significa uma modificação da superfície global de enzima) []. Assim, a busca de novos grupos reativos com o apoio potencialmente útil para estabilizar enzimas via ligação covalente multiponto ainda é uma demanda na concepção biocatalisador.

A este respeito, aceita-ativado com divinil sulfona (DVS) têm sido utilizados com sucesso para imobilizar algumas enzimas [], mas a sua utilização potencial para estabilizar as proteínas imobilizadas e algumas das características relevantes para determinar as suas perspectivas como um suporte para a imobilização de industrial enzimas não foram sequer analisadas.

Activação com DVS pode ser conseguida de suportes de rolamentos na sua superfície uma gama muito ampla de grupos, tal como amino, tiol ou grupos hidroxil []. Os grupos vinil sulfona reactivos colocados no suporte pode reagir com amino, fenol, imidazol ou de grupos tiol as proteínas [], porções que são frequentemente colocados em sua superfície, portanto, úteis para obter muitos enzima suporta ligações.

Neste estudo, analisamos as perspectivas de contas DVS-agarose como suporte para estabilizar enzimas através de fixação multiponto covalente. Por exemplo, a reactividade dos diferentes porções das proteínas em diferentes valores de pH e a estabilidade dos grupos sob condições de imobilização foram analisados, também algumas alternativas para parar a

reação enzima-suporte foram comparados. Em seguida, um modelo de enzima, a alfa-quimotripsina bovina, foi imobilizado sobre o suporte-DVS e as variáveis que determinam a estabilização final foi estudado. Este enzimas foi selecionado porque ele pode ser altamente estabilizada via penhora multiponto covalente, na verdade, tem sido altamente estabilizado após a imobilização em agarose glioxilo [1].

3.3 Materiais e Métodos

Lecitase foi obtida a partir da *Novozymes* (Espanha). Octil-agarose e brometo de cianogênio reticulado 4% (CNBr) foram da *GE Healthcare*. Etilenodiamina (EDA), N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (DEC), ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS), glutaraldeído (solução aquosa a 50%), p-nitrofenil butirato (p-NPB), Triton X-100, dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), *R* e *S* metil mandelato e fenilacetato de metilo foram da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA). Glutaraldeído (25% (v/v) estabilizadas em etanol) foi da *Fluka*. Todos os outros reagentes e solventes eram de grau analítico.

3.3.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada através da hidrólise de uma solução 0,4 mM de p-nitrofenilbutirato (p - NPB) em fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 25 °C (sob estas condições $\epsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para iniciar a reação, 50-100 μL de solução de lipase ou de suspensão foi adicionada a 2,55 mL da solução de substrato. A formação do produto, p-nitrofenol, foi acompanhada em espectrofotômetro a 348 nm.

Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de p-NPB por minuto sob as condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e albumina de soro bovino foi utilizada como referência.

Na determinação dos efeitos do valor do pH sobre a atividade da enzima, o protocolo seguido foi semelhante, mas o tampão nas medições foi alterado de acordo com o valor de pH: de acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 6-8 e borato de sódio a pH 9 e pH 10 a 25 °C, todas as preparações eram inteiramente estáveis após incubação durante várias

horas em qualquer um destes valores de pH. Em alguns casos, foram usadas diferentes concentrações de alguns detergentes.

3.3.2 Imobilização de Lecitase em octil agarose

Lecitase foi imobilizada em suportes octil-agarose em baixa força iônica (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007). 2,8 ml de extrato comercial (16 mg de proteína/mL, com uma atividade pNPB de 5,6 /mg de proteína) foi diluído em 67,5 mL de tampão fosfato de sódio 5mM a pH 7. Em seguida, adicionaram-se 15g de octil-agarose úmida. A atividade do sobrenadante e suspensão foram seguidas usando pNPB. Depois da imobilização, a suspensão foi filtrada e a lipase suportada foi lavada várias vezes com água destilada.

3.3.3 Imobilização de Lecitase em CNBr agarose

Um volume de 2,8 mL de Lecitase comercial foi diluída em 67,5 ml de tampão fosfato de sódio 5 mM contendo 0,05% (m/v) de dodecil sulfato de sódio a pH 7, a 4°C. Em seguida, adicionaram-se 15 g de CNBr. A atividade do sobrenadante e da suspensão foi seguida usando pNPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte em etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Finalmente, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada em abundância.

3.3.4 Modificação química de Lecitase imobilizada

A **Figura 7.1** logo mais apresentada, mostra as diferentes modificações químicas realizadas em Lecitase imobilizada e as abreviaturas utilizadas neste estudo.

3.3.4.1 Aminoação em fase sólida de Lecitase

Assim seguindo os dados apresentados na **Figura 7.1**, dez gramas de Lecitase imobilizada, ou Lecitase-TNBS, ou Lecitase-GLU foram adicionadas a 100 mL EDA 1M, a pH 4,75 sob agitação contínua. (GALVIS *et al.*, 2012). A modificação começou com a adição de DEC sólido (para uma concentração final de 10 mM). Após 2 h de agitação suave a 25 °C,

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3.4.2 Modificação dos grupos amino primários de Lecitase imobilizada com TNBS

De acordo com a **Figura 3.1** ainda, 12 g de Lecitase imobilizada ou Lecitase - EDA foram adicionadas a 100 mL de uma solução de 0,1 % (m/v) TNBS em tampão fosfato de sódio a pH 8,0 e a mistura foi incubada durante 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a preparação de enzima modificada foi lavada com água destilada (BARBOSA *et al.*, 2012). A cor desenvolvida não aumentou, quando uma concentração e volume de TNBS foram dobrados, o que sugere que 100 % dos grupos amino primários expostos na proteína que tinha sido modificada.

Quando este método foi utilizado para determinar a quantidade de grupos amino primários na proteína, 200 mg foram suspensas em uma cubeta contendo 2,2 mL de tampão borato 100 mM, a pH9 e a absorvância a 430nm foi determinada (Barbosa *et al.*, 2012). Como referência, octil-agarose, ou enzima livre bloqueada com CNBr, foi tratada de uma maneira semelhante.

3.3.4.3 Modificação de Lecitase imobilizada com Glutaraldeído

Lecitase imobilizada (**Figura 3.1**) foi incubada com 0,1% (v/v) de solução de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7 e 25 °C durante 1 h, sob agitação suave. Estas condições permitem modificar completamente os grupos amino primários da enzima com apenas uma molécula de glutaraldeído (Barbosa *et al.*, 2012). A suspensão foi então filtrada e lavada com água para remover o excesso de glutaraldeído.

Em seguida, cinco gramas de Lecitase imobilizada e modificada foram adicionadas a 200 mL de tampão borato de sódio 0,1 M contendo 1 mg/mL de NaBH₄, a pH 8,5 e 4 °C; a mistura foi continuamente agitada durante 30 min. Os biocatalisadores reduzidos foram filtrados e lavados várias vezes com água destilada. Este tratamento produziu um decréscimo de 10% na atividade de CNBr-Lecitase, ao mesmo tempo que não apresentou nenhum efeito na atividade das preparações com octil.

3.3.5 Inativação térmica de diferentes Lecitase imobilizado preparações

Para verificar a estabilidade dos derivados de enzimas, 1 g de enzima imobilizada foi suspensa em 5 ml de tampão acetato de sódio 10 mM a pH 5, fosfato de sódio a pH 7 ou carbonato de sódio, a pH 9, a diferentes temperaturas. Periodicamente, foram retiradas amostras e a atividade foi medida usando pNPB. As meias-vidas foram calculadas a partir dos cursos de inativação observados.

3.3.6 Hidrólise de fenilacetato de metila

A atividade enzimática foi determinada usando o fenilacetato de metila; 200 mg das preparações imobilizadas foram adicionadas a 0,2 mL de 5 mM de substrato em tampão 100 mM contendo 50 % de CH₃CN. O tampão foi acetato de sódio a pH5, fosfato de sódio a pH 7, e carbonato de sódio a pH 8,5. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C, sob agitação contínua. O grau de conversão foi analisado por RP - HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 centímetros).

As amostras (20 µL) foram injetadas e eluídas a um fluxo de 1,0 mL / min, utilizando acetonitrila, uma solução aquosa de acetato de amónio 10 mM (35:65, v/v) e pH 2,8, como fase móvel, e detecção por UV foi efetuada a 230 nm. Ácido tem um volume de retenção de 3 ml, enquanto o éster tem um volume de retenção de 12 mL. Uma unidade de

atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mol de ácido fenil acético por minuto sob as condições descritas acima. A atividade foi determinada em triplicada, com um máximo de conversão de 20-30%, e os dados são apresentados como valores médios.

3.3.7 Hidrólise de *R* e *S* mandelato de metilo

A atividade enzimática também foi determinada usando *R* ou *S* mandelato de metila. 400 mg das preparações imobilizadas foram adicionadas a 2 ml de substrato 50 mM em tampão acetato de sódio 100 mM a pH 5, 100 mM de fosfato de sódio a pH 7 ou o carbonato de sódio 100 mM a pH 9 e 25 °C, sob agitação contínua.

O grau de conversão foi analisada por RP - HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 centímetros). Amostras (20 µL) foram injetadas e eluídas a um fluxo de 1,0 mL / min utilizando acetonitrila/tampão acetato de amônio 10 mM (35:65 , v/v) a pH 2,8 como fase móvel. A detecção foi realizada em UV a 230 nm. O ácido tem um volume de retenção de 2,5 ml, enquanto o éster tem um volume de retenção de 10 mL. Uma unidade de atividade enzimática, foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido mandélico por minuto sob as condições descritas acima.

A atividade foi determinada em triplicada, com um máximo de conversão de 20-30 % , e os dados são apresentados como valores médios . Como a reação não é de primeira ordem, a 10 mM, *E* não pode ser calculado a partir de velocidade de reação observada usando o os isômeros *R* e *S* (V_R/V_S), e esta relação direta foi utilizada.

3.3.8 Ensaio de SDS-PAGE

Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli (1970) com uma tetra-célula Miniprotean (Biorad), 12% de gel de corrida de uma zona de separação de 9 cm × 6 cm, e uma zona de concentração de 5% de poliacrilamida. Cem miligramas de amostras de enzimas imobilizadas foram suspensas em 1mL de tampão de ruptura (2% de SDS e 10% de mercaptoetanol), fervidas durante 5 minutos e uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi utilizada nas experiências. Os géis foram corados com Azul de

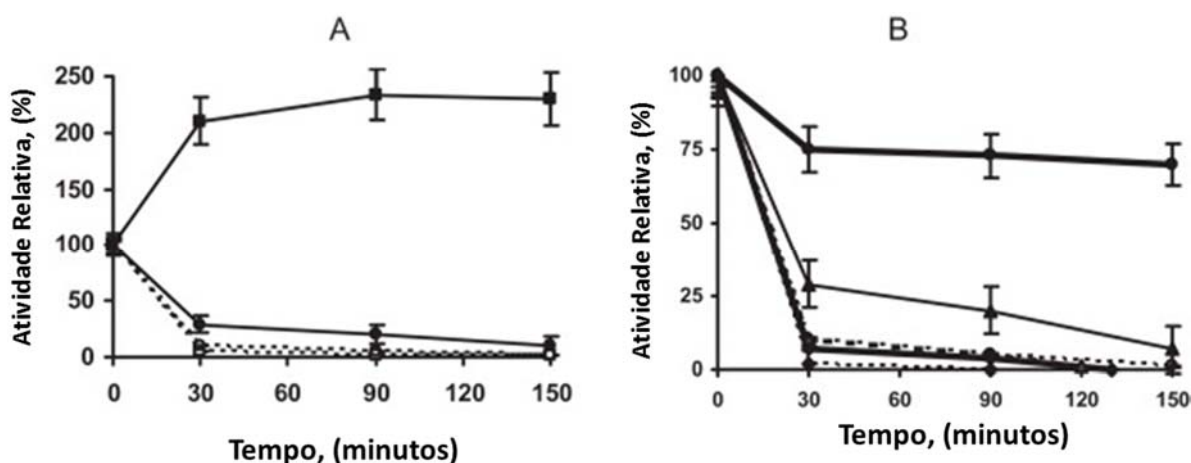
Coomassie. Marcadores de baixo peso molecular da marca Fermentas foram usados (10-200 kDa).

3.4 Resultados

3.4.1 Imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr

A **Figura. 3.2A** mostra o curso de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr-agarose.

Figura 3.2 - Cursos de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr. As condições experimentais estão detalhadas na Seção 3.1. (A) Imobilização, na ausência de SDS. Quadrados: octil-agarose; círculos: CNBr-agarose. As linhas sólidas: suspensão, as linhas tracejadas: sobrenadantes. (B) Efeito de SDS sobre os cursos de imobilização de Lecitase em CNBr-agarose. Triângulos: 0,05% SDS (v/v); Losango: SDS a 0,1% (v/v).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em octil-agarose, a maior parte da enzima já está imobilizada depois de 0,5 h, e o aumento da atividade é mais do que um fator de 2 vezes. Quando a imobilização da enzima ocorre em CNBr, esta é rapidamente incorporada no suporte (mais do que 90%), mas a atividade sofre uma queda drástica (menos do que 5% da atividade inicial é observada no suporte). A inativação da enzima segue próxima a imobilização. Isto é surpreendente, já que as condições de imobilização são muito leves e não se esperava uma reação tão intensa entre enzima/suporte.

Tentando melhorar a recuperação da atividade enzimática em CNBr, foram realizados ensaios com vários detergentes, tentando encontrar um que poderia manter a forma

aberta da Lecitase e manter a enzima na forma monomérica (PALOMO *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003), tendo um baixo impacto sobre a sua estabilidade.

Verificou-se que o SDS era o único com um menor efeito sobre a estabilidade da Lecitase. A **Figura 3.2B**, nos possibilita observar que o efeito da presença de diferentes concentrações de SDS sob os valores de atividade durante a imobilização da enzima. A imobilização permaneceu muito elevada uma vez que a atividade residual no sobrenadante foi baixa, e usando 0,05 % de SDS durante a imobilização, em torno de 70% da atividade inicial da enzima depois de 2,5h de imobilização foram recuperados, este resultado se vê na curva da suspensão da figura 3.2B.

Os efeitos do detergente podem ser vários. Por um lado, algumas áreas da enzima podiam ser bloqueadas por este detergente, dessa forma evitando a imobilização por essa área, até mesmo impedir a reação de alguns grupos. Por outro lado, um detergente pode estabilizar a forma aberta da lipase, se o problema depois da imobilização em CNBr é a dificuldade para a abertura da forma da enzima, a imobilização na presença de detergente pode resolver isto (PALOMO *et al.*, 2003). Além disso, se Lecitase tende a formar dímeros (como muitas lipases fazem (PALOMO *et al.*, 2003; PALOMO *et al.*, 2003)), o detergente irá quebrá-los, permitindo assim a imobilização da forma monomérica da enzima. Estas condições de imobilização foram utilizadas como padrão para a preparação dos biocatalisadores utilizados neste trabalho.

3.4.2 Efeito das modificações químicas sobre a atividade da enzima

Ambas as preparações enzimáticas foram submetidos a modificações químicas como fora mostrado na **Figura 3.1**. (pag. XX). O efeito sobre a atividade da enzima em condições padrão pode ser encontrado na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 - Efeito das modificações químicas sobre as atividades frente a pNPB das diferentes preparações. A atividade foi determinada a pH 7 e 25 °C, tal como indicado no ponto 2. GLUTA, glutaraldeído. A atividade é determinada como U/mg.

Modificação química	Biocatalisador	
	Octil-Lecitase	CNBr-Lecitase
Nenhuma	26 ± 1	0.9 ± 0.05
EDA	35 ± 1	1.1 ± 0.05

TNBS	12.5 ± 0.5	2.4 ± 0.1
GLUTA	18. ± 1	0.54 ± 0.04
EDA-TNBS	20.5 ± 1	0.45 ± 0.03
EDA-GLUTA	16.5 ± 1	0.26 ± 0.02
TNBS-EDA	11.5 ± 0.6	0.32 ± 0.02
GLUTA-EDA	15.2 ± 1	0.4 ± 0.03

Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando octil-Lecitase, a aminação produziu um aumento na atividade da enzima (em cerca de 35%), enquanto que com TNBS (foram cerca de 50% de recuperação da atividade) e com glutaraldeído produziu uma diminuição (cerca de 70%) da atividade da enzima.

A modificação da enzima aminada com TNBS diminuiu a atividade em 40%, ligeiramente menor do que modificando o derivado inalterado de octil-Lecitase, embora agora o número de grupos modificados seja muito maior. O tratamento deste biocatalisador com glutaraldeído reduziu a atividade em cerca de 50%, na verdade, esta modificação reverteu o efeito positivo da aminação e foi menos ativa do que a enzima apenas modificada com glutaraldeído.

Por outro lado, a aminação da enzima modificada com TNBS ou glutaraldeído causou uma ligeira diminuição da atividade enzimática. A situação foi diferente usando a enzima imobilizada covalentemente. Em primeiro lugar, a atividade inicial é muito mais baixa que usando octil-agarose, quase um fator de 30 vezes (medidas agora são realizadas em ausência de detergente).

Aminação produziu uma ligeira melhoria na atividade da enzima, enquanto a modificação com glutaraldeído diminuiu a atividade em 40%. No entanto, a modificação com TNBS aumentou a atividade em mais do que um fator de 2,5 vezes. O glutaraldeído ou tratamento de TNBS da enzima aminada produziu uma redução severa na atividade da enzima

(cerca de 20 e 40% de recuperação da atividade, respectivamente), muito mais expressiva do que utilizando a enzima não modificada.

A aaminação da enzima modificada com TNBS produziu a perda de todo o efeito positivo da modificação com TNBS, e até mesmo promoveu uma redução ainda maior na atividade enzimática (atividade caiu 2,5 - 0,32 U/mg). Isto é inesperado, considerando que ambas as modificações independentes têm efeitos positivos sobre a atividade da enzima. A aaminação da enzima modificada com glutaraldeído também teve um efeito negativo na atividade, mas não tão negativo. Assim, os efeitos das modificações químicas nas propriedades da enzima dependem fortemente da estratégia de imobilização, e elas não são necessariamente aditivas, em alguns casos, sucessivas modificações tem um impacto menor sobre a atividade da enzima que em cada uma das modificações individuais ou até mesmo efeito oposto.

Considerando-se que para alterar o delicado equilíbrio de forças que estabilizam a forma aberta da lipase, uma explicação específica para cada um dos os resultados individuais pode ser quase impossível. No entanto, as diferenças nas preparações imobilizadas podem ser pelo menos uma explicação parcial para o efeito diferente da modificação química nos derivados de Lecitase imobilizada de forma covalente e adsorção interfacial.

Em Lecitase imobilizada em octil-agarose foi estabilizada a forma aberta, isto significa que qualquer efeito na modificação química fundada sobre as mudanças no equilíbrio aberta/fechada será minimizado agora. Além disso, a área com molécula da enzima imobilizada está em estreito contato com a superfície hidrofóbica do suporte, e este pode alterar a sua reatividade (em alguns casos, pode ser que o grupo não é acessível para a modificação, em outros, alguma partição pode aumentar ou diminuir sua aparente reatividade). Para aumentar a informação sobre o efeito da modificação da atividade da enzima, estudou-se a atividade em pH5 a pH10.

3.4.3 Efeito do pH sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase

A **Figura 3.3** mostra o perfil de atividade das preparações de octil- e CNBr-Lecitase em função do pH. Os perfis são muito diferentes. Embora a enzima imobilizada covalentemente apresente claramente um ótimo de atividade a pH 6 e retenha apenas cerca de 40% de atividade a pH 10, o derivado octil-Lecitase não tem um valor de pH ótimo claro no

intervalo estudado, atividade em um plano a partir de pH 8-10, com uma certa tendência para aumentar a atividade até ao valor de pH mais elevado analisado (valores de pH mais elevados apresentavam uma hidrólise química muito rápida do substrato pNPB, o que inviabiliza a correta interpretação dos dados).

Considerando que o derivado octil-Lecitase já está estabilizado, coma forma aberta da enzima, a importância do valor de pH com o derivado de CNBr pode ser uma explicação provável para estes resultados muito diferentes. Em relação ao efeito das modificações químicas em que este perfil, é muito diversificado.

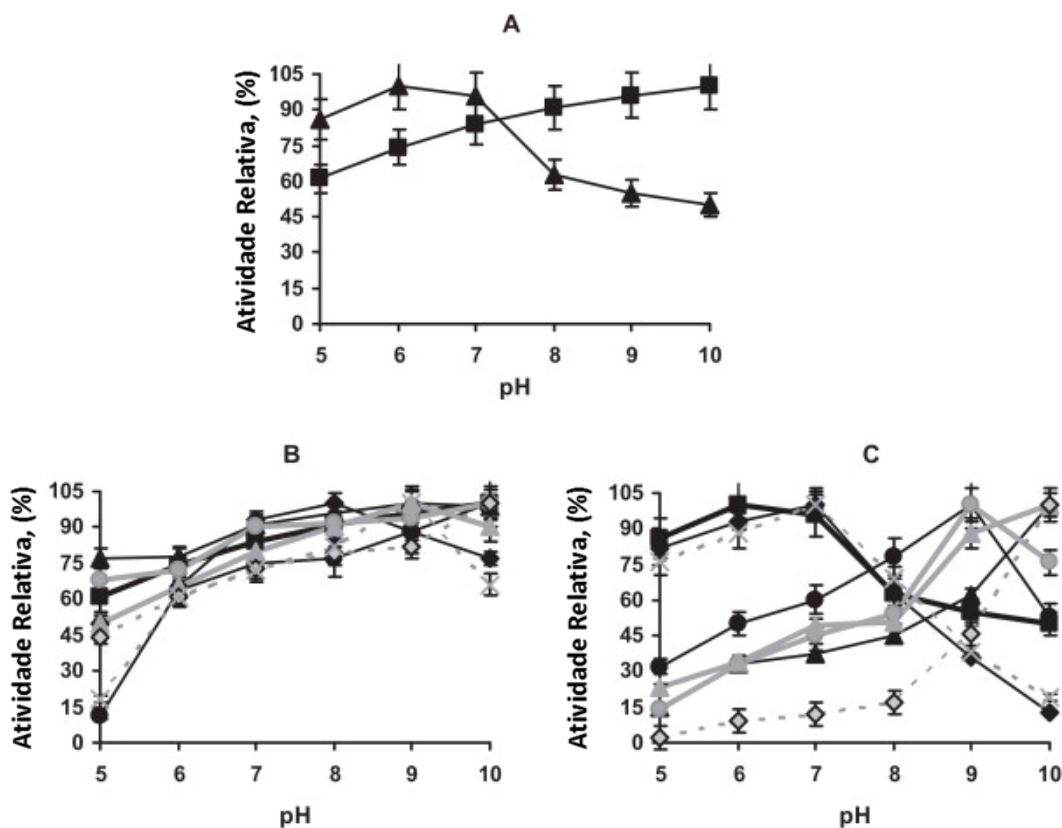
Primeiro, vamos concentrar-nos sobre os derivados com octil (**Figura 3.3B**). A aaminação promoveu pouca modificação, uma vez que o perfil permaneceu inalterado. Isso foi muito surpreendente, considerando a mudança radical das interações iônicas comparando a enzima modificada e não modificada, e a mudança dramática que esta modificação química deve produzir sobre a forma como o pH pode afetar essas interações.

A modificação com TNBS ocasionou a diminuição da atividade a valores de pH inferiores a 8 e o efeito é mais significativo a valores de pH ácido (a pH 5 os derivados de octil modificados com TNBS mantiveram apenas 15% da atividade, enquanto o derivado não modificado manteve 61%). A modificação com glutaraldeído produziu um perfil de atividade /pH mais estreito, com uma atividade máxima em pH 8, com uma redução mais significativa da atividade, tanto em valores ácido como em básicos de pH.

A aaminação da preparação TNBS-Lecitase promoveu certa recuperação da atividade a valor de pH ácido (cerca de 50 % de retenção da atividade a pH 5). No entanto, o efeito da aaminação é claramente negativo para a atividade da preparação modificada com glutaraldeído em valor de pH ácido (ocorre diminuição na atividade de 50 % a 15 % , a pH 5). Nota-se ainda queo pH ótimo da preparação com glutaraldeído muda de 8 a 9.

A modificação com TNBS da enzima aminada tem quase nenhum efeito sobre o perfil de atividade /pH . E a modificação com glutaraldeído da enzima aminada tem um efeito sobre o perfil atividade /pH semelhante a modificação da preparação octil não modificada, mas deixando um valor de pH ótimo claro a pH 9.

Figura 3.3 - Efeito do pH sobre a atividade frente a pNPB das diferentes preparações de Lecitase. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 (A) Efeito do protocolo de imobilização: octil-Lecitase: Quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos. (B) (octil-Lecitase) e (C), (CNBr-Lecitase). Efeito da modificação química. *Uma modificação:* linhas pretas sólidas. Quadrados: Nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, losango: GLUTA. *Modificação da Lecitase aminada:* linhas cinza sólidas. Círculo cinza: TNBS, Círculo: GLUTA. *Aminação de Lecitase modificada:* linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruz Cinzenta: GLUTA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A **Figura 3.3C** mostra o efeito das modificações sobre o pH /atividade de Lecitase imobilizada sobre CNBr. Neste caso, as alterações são muito mais evidentes do que quando se utiliza octil-Lecitase. A aminação fez com que a atividade máxima fosse observada no valor mais elevado de pH estudado, o pH 10. Sob estas condições, a atividade absoluta da enzima modificada foi 6 vezes maior do que a da enzima não modificada (0,5 contra 3 U/mg de enzima). No entanto, no pH de 5, a modificação reduziu a atividade da enzima em cerca de um fator de 2 vezes.

A modificação com TNBS provocou uma variação no valor ótimo de pH, de 6 a pH 9 (a este valor de pH da modificação aumentou 8 vezes a atividade enzimática, entre 0,5 e 4 U/ mg). Na faixa de pH ácido, esta diferença é mais curta (por exemplo, a um pH de 5 foi de 0,8 a 1,3). A modificação com glutaraldeído produziu um ligeiro desvio do valor de pH

ótimo (até pH 7), com redução muito significativa da atividade nos valores de pH alcalinos (pH 10 a atividade diminuiu após a modificação de 0,5 a 0,08).

A aminação da enzima modificada com TNBS deslocou para pH 10 a máxima a atividade. Neste valor de pH, a aminação produziu um incremento da atividade da enzima (de 2,1 a 2,6 U/mg), que é cinco vezes maior do que a da enzima não modificada (0,5 U / mg). No entanto, a pHs ácidos, o efeito é muito negativo, a pH 5, por exemplo, a atividade foi de 1,3 a 0,06, mais baixa do que a da enzima apenas aminada (0,8 U/mg). A aminação da Lecitase modificada com glutaraldeído não tem um claro efeito sobre o perfil de atividade em função do pH, apenas um melhor desempenho em valores de pH alcalino (na verdade, as atividades tornam-se idênticas a pH 10).

O tratamento da enzima aminada com TNBS não afetou o valor de pH ótimo; mas a atividade diminuiu em valores de pH mais alcalinos ou ácidos, resultando em uma curva estreita. Usando glutaraldeído na enzima aminada, o perfil de atividade/ em função do pH permaneceu quase inalterado.

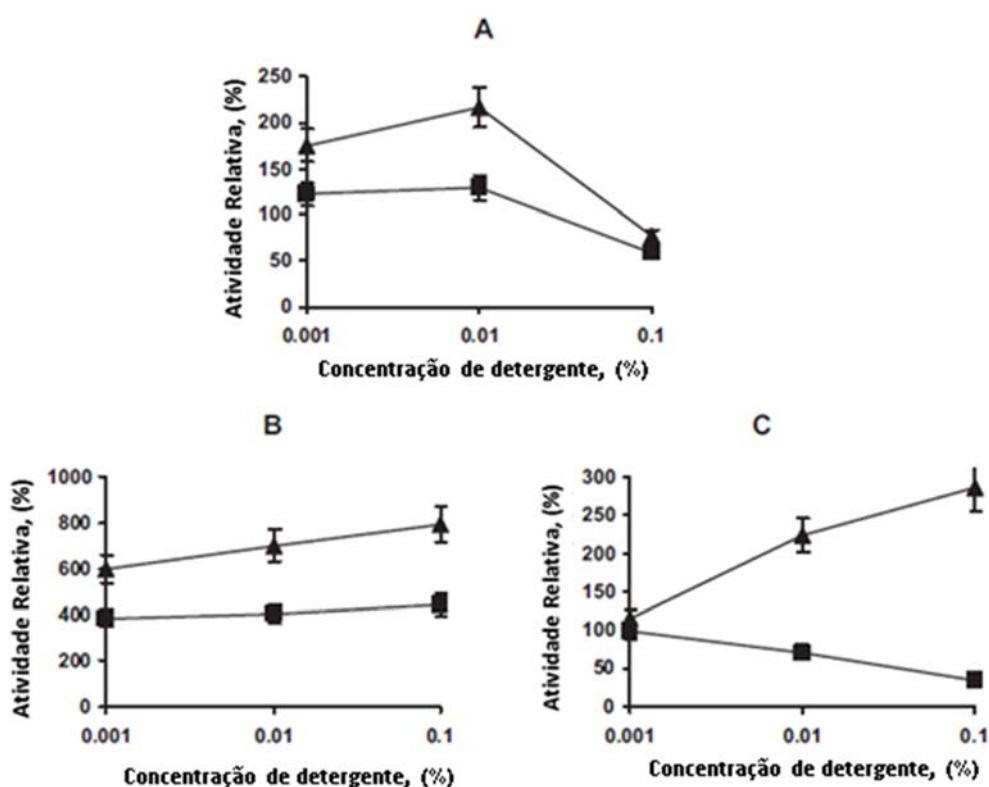
Os resultados obtidos mostram como o efeito de uma modificação química é fortemente dependente do valor de pH, algumas modificações positivas a um valor de pH, podem se tornar muito negativas em outro. O efeito do pH sobre a atividade da enzima depende da estratégia empregada na imobilização; algumas explicações prováveis foram detalhadas anteriormente.

3.4.4 Efeito da presença de detergentes na atividade da enzima

As **Figuras 3.4, 3.5 e 3.6** mostram o efeito da presença de diferentes concentrações de detergentes sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase imobilizada. O efeito do detergente sobre a atividade da enzima pode ser devido a razões diferentes. Em primeiro lugar, pode estabilizar a forma aberta da lipase (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006). Em segundo lugar, o detergente pode alterar a conformação da enzima, gerar sua inativação ou hiperativação, e também produzir uma desestabilização (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007; MOGENSEN *et al.*, 2005). Além disso, o detergente pode atuar como um inibidor competitivo (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Assim, não é provável que para cada preparação enzimática (que esperamos ter uma conformação alterada) o efeito de um detergente pode ser inteiramente diferente, por exemplo, as preparações com octil não pode sofrer ativação por estabilização da enzima pela forma aberta, uma vez que ela já está imobilizada e estabilizada nessa forma (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Figura 3.4 - Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de Lecitase imobilizada. Os experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2. Octil-Lecitase: quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos.



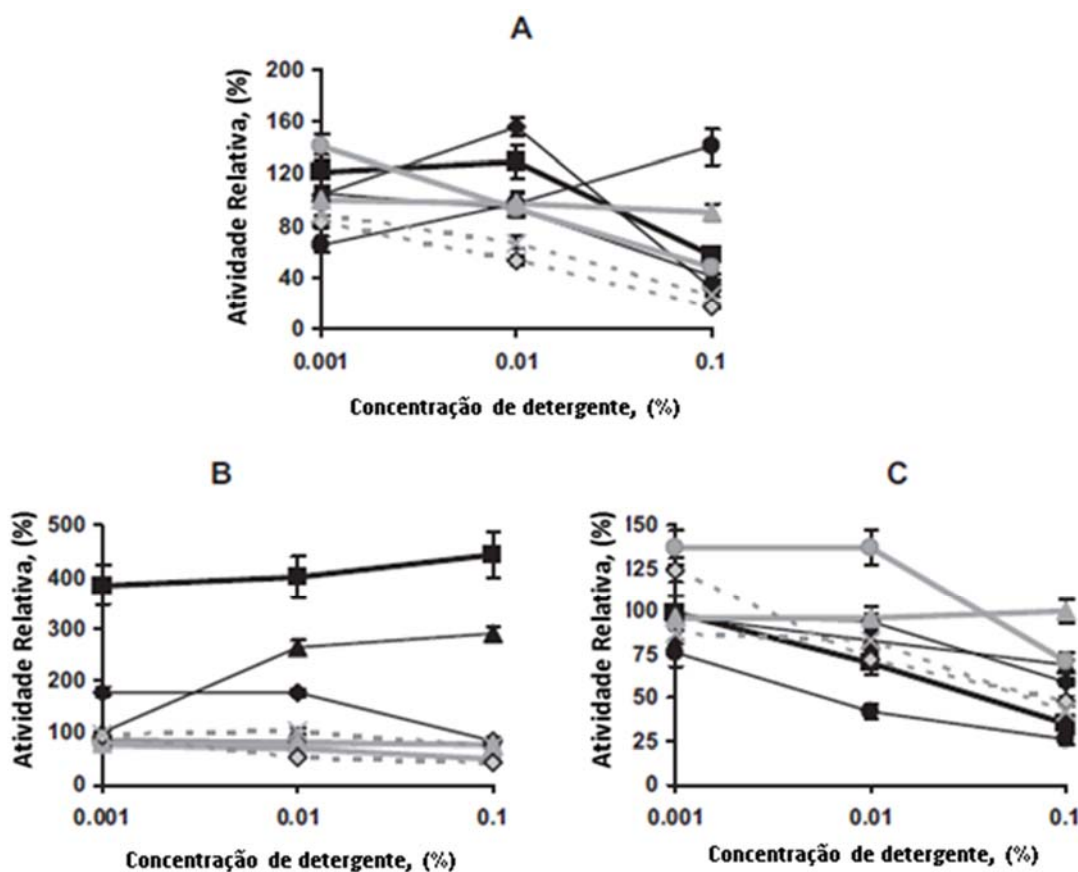
Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando SDS (0,001 a 0,01% (v/v) o derivado octil-Lecitase teve um aumento na atividade (Figura 3.4A) de 120%, enquanto que usando 0,1% de SDS ocorreu diminuição da atividade em 60% (não ocorreu dessorção da enzima utilizando estas concentrações de detergente, concentração de proteína foi determinada usando pelo método de Bradford). Usando CNBr-Lecitase, o incremento da atividade é mais significativo e atinge um máximo

quando usando 0,01% de SDS (mais de 215%), reduzindo para 75% quando se usou 0,1% de detergente.

As diferenças entre as duas preparações imobilizadas seguem a tendência esperada, um efeito maior sobre o CNBr-Lecitase que no octil-Lecitase foi observado. Em seguida, foi analisado se a modificação química pode alterar o efeito do detergente, considerando a sua natureza aniônica.

Figura 3.5 - Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de octil-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 *Uma modificação*: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. *Modificação da Lecitase aminada*: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. Aminoação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Começando com as preparações com octil (**Figura 3.5A**), a aminoação parece evitar o efeito positivo do SDS na atividade enzimática, e ainda produz uma diminuição na

atividade da enzima em concentrações mais baixas de SDS (por exemplo, a 0,01% (v/v), a atividade está em 90%, enquanto antes era de 120%). A modificação com TNBS provocou um efeito positivo do SDS, foi detectada na maior concentração usada (0,1%), enquanto o tratamento de glutaraldeído não teve quase nenhum efeito sobre o SDS sobre a atividade da enzima.

A aminação da enzima modificada com glutaraldeído elimina os efeitos positivos do SDS na enzima modificado com glutaraldeído, enquanto que a aminação da enzima modificado com TNBS aumenta os efeitos negativos do SDS sobre a enzima modificada com TNBS. O tratamento com glutaraldeído da enzima aminada permitiu manter em torno de 100%, quando utilizando SDS entre 0,001 a 0,1% (v/v), enquanto que o tratamento com TNBS deu como resultado uma atividade enzimática com um comportamento muito semelhante ao da enzima não modificada.

Usando CNBr-Lecitase, os resultados são diferentes (**Figura 3.6A**). A aminação promoveu uma diminuição na atividade da enzima em concentrações mais baixas de SDS; enquanto que a modificação com TNBS causou um efeito positivo com SDS, duplicando a atividade da enzima na máxima quantidade de SDS utilizada neste estudo (0,1%, v/v). A enzima modificada com Glutaraldeído diminuiu progressivamente a atividade para todas as concentrações de SDS analisadas.

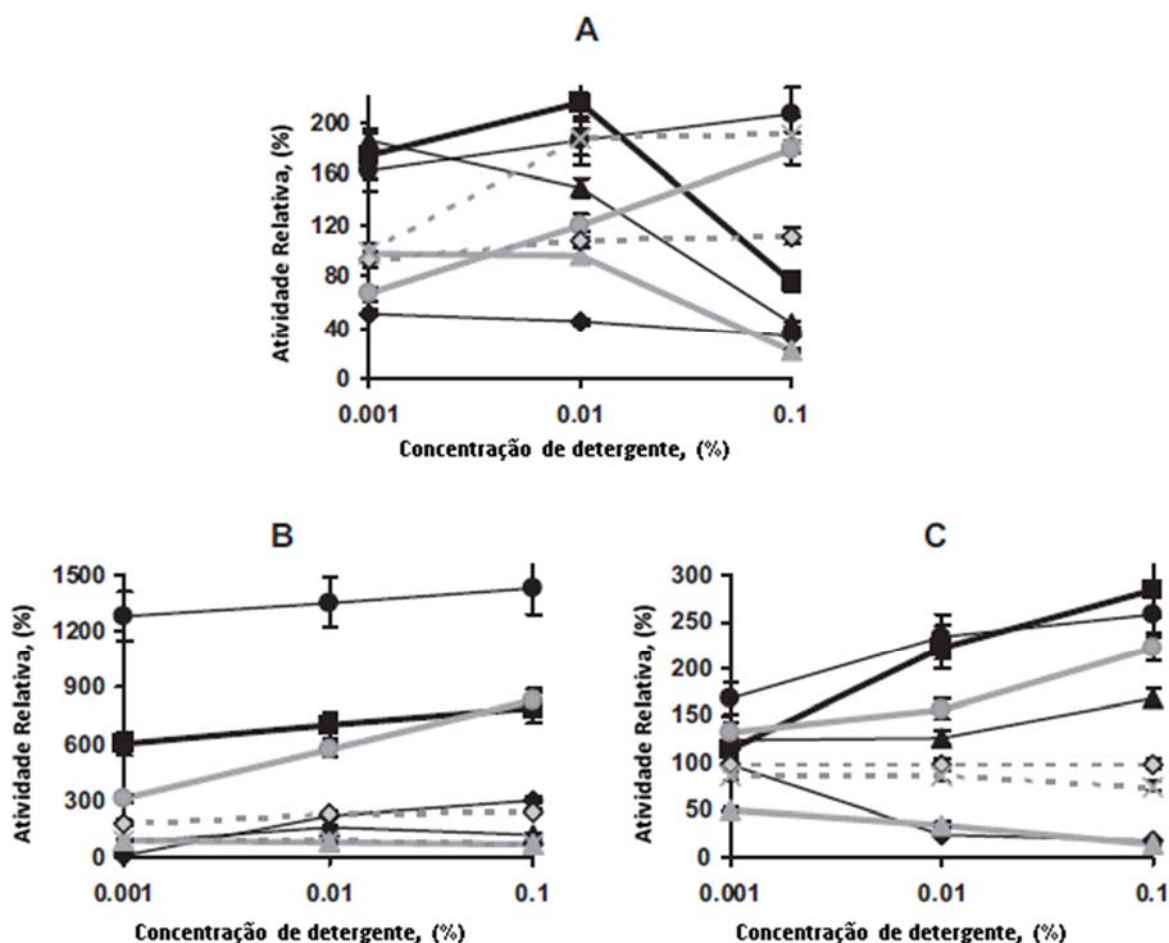
A aminação da enzima modificada com TNBS não apresentou influencia sobre a atividade enzimática pela presença de SDS, contudo quando se usou a enzima modificada com glutaraldeído, a aminação impediu o decréscimo de atividade no intervalo de 0,001 e 0,01 % de SDS, mas não a 0,1%. A modificação com TNBS da enzima aminada teve um efeito semelhante para a mesma alteração na enzima imobilizada e não modificada (atividade máxima foi detectada com SDS a 0,1%), enquanto a modificação com glutaraldeído permitiu melhorar a atividade em elevada concentração de SDS (desde 44 % de aumento de atividade até 190 % usando 0,1 % de SDS).

O CTAB, um detergente catiônico que pode ajudar a compreender os efeitos dos outros detergentes, foi utilizado, embora se tenha verificado que a incubação em longo prazo de soluções de Lecitase com este detergente diminuiu sua atividade. No entanto, em poucos minutos, em geral o tempo para se determinar a atividade, esta inativação é completamente negligenciável na faixa de concentrações estudadas.

Para o octil-Lecitase (Figura 4B), a atividade aumentou para mais de 440% usando 0,1% de CTAB, a concentração máxima utilizada (em que a enzima não foi

encontrada em solução, ou seja não ocorreu dessorção). Usando CNBr, o incremento da atividade chegou a um fator de 8 vezes. Assim, CTAB apresentou um mesmo efeito mais positivo sobre a atividade da enzima em comparação com SDS, utilizando ambas as preparações imobilizadas. Em seguida, analisamos o efeito da modificação química na atividade da enzima na presença de CTAB (Figuras. 3.5B e 3.6B). A maioria das modificações reduziu os efeitos positivos de CTAB sobre a atividade da enzima para ambas as preparações imobilizadas.

Figura 3.6 - Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de CNBr-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 *Uma modificação*: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. *Modificação da Lecitase aminada*: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. *Aminação de Lecitase modificada*: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Usando o derivado aminado de octil-Lecitase (**Figura 3.5B**), o aumento da atividade também foi observado em todas as concentrações de CTAB estudadas, mas com um máximo de 0,1% (v/v) de CTAB o incremento foi de 290%. Contudo, após a modificação com TNBS, a enzima diminuiu progressivamente a sua atividade com o aumento da concentração de CTAB.

A modificação com glutaraldeído, também reduziu os efeitos positivos do CTAB, apenas 85% da atividade inicial foi observada com 0,1% de detergente. A aminação desta preparação quase não tem influência sobre o efeito do detergente, enquanto que, nas preparações com TNBS aminadas ocorreu diminuição da atividade com a concentração de CTAB (para menos de 45% com 0,1% de CTAB, cerca de 7 vezes menor do que enzima imobilizada sem modificação). Ambas as modificações da enzima aminada também eliminaram o efeito positivo do CTAB (**Figura 3.5B**).

Usando a preparação imobilizada de forma covalente (**Figura 3.6B**), a aminação diminuiu fortemente o efeito positivo de CTAB na atividade enzimática, na verdade, a ativação máxima (apenas 160%) se observa com 0,01%, com uma diminuição na atividade da enzima em 0,1% de detergente. A modificação com glutaraldeído reduziu o efeito, mas ainda assim a hiperativação foi significativa e a atividade máxima é obtida em 0,1%.

O resultado mais favorável foi obtido usando TNBS, quando a atividade cresceu progressivamente até chegar a um aumento de 1.500%, considerando que essa preparação já foi 2,5 mais ativas do que a enzima sem modificação, a atividade final com 0,1% CTAB é quase 5 vezes maior ao utilizar esta enzima modificada do que usando a enzima sem modificações (em valores absolutos) foi usada.

A modificação da enzima aminada com TNBS também melhorou significativamente o desempenho da enzima na presença de CTAB, ocorreu uma hiperativação de 8,5 vezes em 0,1% de detergente. Já a modificação com glutaraldeído da enzima aminada em presença de CTAB apresentou um ligeiro efeito negativo sobre a atividade da enzima (mais do que 70% utilizando 0,1% de CTAB, **Figura 3B**).

A aminação da enzima modificada com TNBS produziu uma diminuição na hiperativação provocada pelo CTAB, mas o valor máximo ainda foi observado quando utilizando 0,1% de CTAB. Assim aaminação da enzima modificada com glutaraldeído produziu uma insensibilidade moderada na enzima para com os efeitos do CTAB (uma diminuição progressiva leve na atividade, até atingir 80% utilizando 0,1% de CTAB).

Finalmente, analisou-se o efeito de um detergente não iônico na atividade enzimática das diferentes preparações, Triton X-100 (**Figuras 3.4C, 3.5C e 3.6C**). O derivado octil-Lecitase diminuiu progressivamente a atividade enzimática na presença de Triton (atividade é apenas de 30% em 0,1% de detergente (v /v)) (**Figura 3.4C**). Contudo, com CNBr- Lecitase ocorreu aumento significativo na atividade de maneira progressiva quando Triton foi adicionado ao meio (a hiperativação foi quase de 3 vezes a 0,1% de detergente) (**Figura 3.4C**).

Considerando o uso do octil- Lecitase (**Figura 3.5C**), a aminação reduziu o efeito negativo da presença de detergente sobre a atividade da enzima (70% de atividade em 0,1% de detergente), a modificação com glutaraldeído não teve nenhum efeito sobre a atividade da enzima e somente quando usando 0,1% de detergente produziu uma clara diminuição na atividade da enzimática, enquanto que o TNBS fez que a atividade da enzima diminuísse rapidamente na presença deste detergente, com um 25 % de atividade residual em 0,1% de Triton.

Curiosamente, a aminação desta preparação modificada com TNBS permitiu observar certo aumento da atividade da enzima na presença de baixa concentração de Triton (140%, utilizando 0,001% de detergente), e reduziu os efeitos negativos em concentrações de detergente mais elevadas (50%, quando utilizando 0,1% de detergente) (**Figura 7C**). A aminação da enzima modificada com glutaraldeído teve quase nenhuma influência sobre o efeito do Triton X - 100 na atividade da enzima.

Por outro lado, a modificação com TNBS da enzima aminada permitiu ter certa hiperativação quando usando 0,001 e 0,01 % de detergente (cerca de 1,4 vezes) , mas na presença de 0,1 % de detergente a atividade relativa foi muito semelhante a enzima unicamente aminada . A modificação com glutaraldeído desta enzima aminada, no entanto, permitiu manter a atividade da enzima inalterada em toda a gama de [Triton X - 100] estudada, apresentando maior atividade quando usando 0,1% de detergente (**Figura 3.5C**).

Usando a preparação covalente (**Figura 3.6C**), a aminação permitiu obter um desempenho semelhante na atividade da enzima com baixa concentração de detergente, enquanto a hiperativação em concentrações mais elevadas foi menor. A modificação com glutaraldeído causou uma diminuição drástica na atividade da enzima na presença deste detergente (15 % com 0,1 % de detergente), enquanto a modificação com TNBS quase deixou o efeito desse detergente na atividade enzimática inalterada (**Figura 3.6C**).

A aminação com glutaraldeído da enzima modificada reverteu parcialmente os efeitos muito negativos da modificação com glutaraldeído, enquanto a aminação da enzima modificada com TNBS não produziu nenhum efeito em todas as faixas de concentrações de detergente estudada. A modificação da enzima aminada com TNBS recuperou o efeito do triton sobre a atividade da enzima modificada ou enzima modificada apenas com TNBS, revertendo à ausência do efeito da aminação. No entanto, a modificação com glutaraldeído da enzima aminada aumentou o efeito negativo de Triton X - 100 sobre a atividade da enzima (**Figura 3.6C**).

Os resultados sugerem que os efeitos positivos do detergente podem não estar baseados apenas na estabilização da forma aberta da enzima, mas também em algumas mudanças conformacionais "globais", como a hiperativação apresentada em alguns casos para os derivados com octil, na presença de detergentes, menor do que com os derivados em CNBr mas bastante significativa ainda.

O uso de enzimas enriquecidas com grupos catiônicos ou com grupos mais hidrofóbicos pendentes na sua estrutura modifica significativamente o efeito dos detergentes. No entanto, regras não podem ser observadas. Aminação da enzima deveria aumentar o número de moléculas de SDS que interage com a enzima, tornando a interação do detergente catiônico mais difícil. Isto pode produzir efeitos semelhantes usando concentrações muito baixas de SDS, mas exige uma maior quantidade de CTAB.

No entanto, esta tendência não é geralmente observada. A modificação com TNBS deveria produzir um efeito semelhante com todos os detergentes uma vez que novos grupos hidrofóbicos foram introduzidos na enzima. Contudo, em alguns casos esta modificação reduz os efeitos dos detergentes, enquanto em outros produz aumentos sobre a atividade da enzima.

O glutaraldeído deve aumentar a rigidez da enzima (se algumas ligações cruzadas inter- ou intramoleculares são formadas) (BARBOSA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2012), o que pode tornar a enzima menos sensível à ação dos detergentes. No entanto, neste estudo, isto foi observado em alguns casos, enquanto que em outros casos, a modificação com glutaraldeído aumentou principalmente os efeitos negativos frente aos detergentes.

3.4.5 Estabilidade Térmica

A modificação química da superfície da proteína pode produzir algumas alterações inesperadas na estabilidade da enzima (BARBOSA *et al.*, 2012). Aquelas alterações na estabilidade da enzima podem depender das condições da inativação (por exemplo, o valor de pH), principalmente, considerando as mudanças na enzima ionização ou equilíbrio hidrofobicidade/hidrofobilidade (RODRIGUES *et al.*, 2011).

A **Tabela 3.2** mostra a meia-vida das preparações enzimáticas sob diferentes condições. A temperatura foi selecionada de acordo com a estabilidade da enzima, sob os diferentes valores de pH.

Tabela 3.2 - Estabilidade térmica das diferentes preparações de enzimas modificados dadas como meia-vida em minutos. As temperaturas foram 55 °C em pH 7, 53 °C em pH 9 e pH 5 e 49 °C. Outras especificações estão descritas na Seção 2.

Modificação química	Biocatalisador/pH					
	Octil/pH5	Octil/pH7	Octil/pH9	CNBr/pH5	CNBr/pH7	CNBr/pH9
Nenhuma	267 ± 15	48 ± 3	37±3	60±3	63±3	40±3
EDA	406 ± 20	180 ± 10	112±9	60±4	56±3	29±2
TNBS	28 ± 1	22 ± 1	22±12	60±5	30±2	542±30
GLUTA	120 ± 5	154 ±10	511±30	11±1	30±2	42±3
EDA-TNBS	36 ± 1	26 ±1	27 ± 4	311±20	230±20	259±20
EDA-GLUTA	315 ± 10	191 ±10	278 ±15	364±25	120±10	41±4
TNBS-EDA	65 ± 4	34 ±2	37 ±2	34±3	40±3	43±2
GLUTA-EDA	366 ± 20	279 ±20	239 ±15	110±9	44±4	41±3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em pH 7 e 55 °C, a preparação covalente é ligeiramente mais estável do que a imobilizada em octil-Lecitase (meias-vidas de 63 e 48 min), enquanto que a pH 5 e 50 °C, a preparação em octil-agarose é muito mais estável (meias-vidas de 60 e 267 min) e em 53 °C e pH 9, as duas preparações são quase idênticas (cerca de 40 min). Isso já foi verificado com algumas lipases que quando imobilizadas interfacialmente são mais estáveis que quando são imobilizadas via ligação covalente multipontual (PALOMO *et al.*, 2012).

Com isso a preparação com CNBr foi realizada de forma que não favorecesse uma intensa ligação covalente multipontual (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). No entanto, o efeito

da imobilização de Lecitase em octil-agarose não parece tão positivo como para outras lipases, apenas a pH 5, a preparação de octil é claramente mais estável do que a preparação covalente.

A aminação aumentou as meias-vidas em octil-Lecitase (por um fator de 3 a 4 vezes em pHs 7 e 9, e por 1,5 a pH 5), ao passo que a aminação do CNBr-Lecitase não teve nenhum efeito sobre a estabilidade da enzima (por exemplo, pH 7 e 5) ou esse efeito foi ligeiramente negativo (por exemplo, pH 9).

A modificação com TNBS apresentou um efeito muito negativo sobre estabilidade da enzima utilizando o octil-Lecitase, principalmente, a pH 5 (quase um fator de 10 vezes menor). No entanto, a preparação covalente após a modificação com TNBS retirou a estabilidade a pH 5, este tratamento diminuiu por um fator de 2 vezes a pH 7, enquanto a pH 9 foi aumentado por um fator de 12 vezes.

O tratamento com glutaraldeído também produziu resultados mistos sobre a estabilidade da enzima. Octil - Lecitase aumentou a estabilidade por um fator de 15 vezes a pH 9 e por um fator de 3 vezes a pH 7, mas reduziu a estabilidade em 2 vezes a pH 5. Esse efeito de glutaraldeído sobre a estabilidade da enzima pode ser atribuído a uma reticulação intramolecular da enzima.

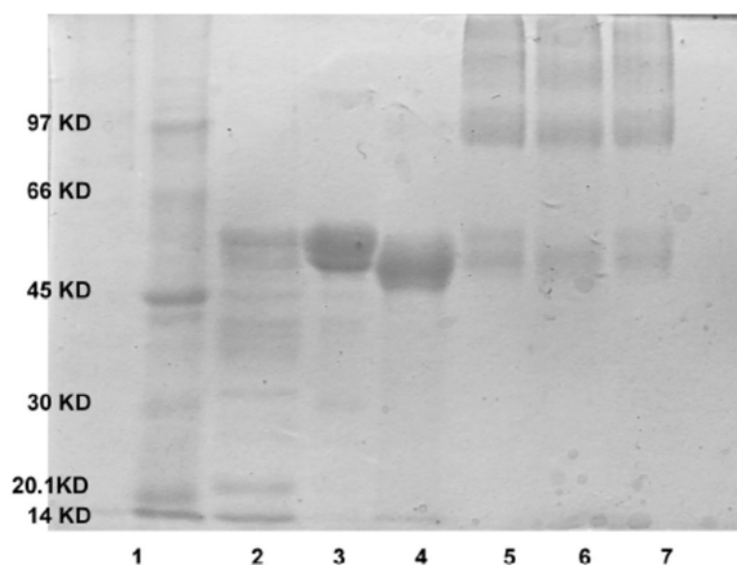
Para verificarmos se pelo menos há alguma reticulação intermolecular, a preparação foi submetida a um SDS-PAGE (**Figura 3.7**), que revelou muitos agregados (bandas proteicas com um peso molecular aparente mais elevada), o que confirma que, pelo menos, muitas moléculas foram intermolecularmente reticuladas covalentemente.

Talvez o efeito negativo da hidrofobização da cadeia Lys (já visualizados após a modificação de TNBS) não poderia ser revertido pelos efeitos positivos da reticulação, e pode ser que muitas ligações cruzadas intermoleculares não tenham sido formadas (a modificação foi muito rápida, de apenas 30 min antes da redução). Usando a preparação de CNBr, a estabilidade não foi alterada pelo tratamento com glutaraldeído a um pH de 9, que diminuíram por um fator de 2 vezes a pH 7, e um aumentou por uma fator de duas vezes a um pH de 5.

A modificação da enzima aminada com TNBS também produziu efeitos diversos. Usando octil-Lecitase aminada, a estabilidade da enzima é reduzida para valores semelhantes aos do TNBS-octil-Lecitase, em todos os valores de pH. No entanto, usando a preparação com CNBr, a estabilidade da enzima aminada aumentou após modificação com TNBS (um fator de 4 a 5 vezes a pH 7 e 5,8 vezes a pH 9), deixando esta enzima duplamente modificada como uma preparação mais estável do que o a enzima não modificada. Isto ocorreu apesar da

modificação ter causado efeito positivo somente quando utilizando a enzima nativa em pH 9. O incremento de moléculas de TNBS incorporadas na enzima, quando utilizando a enzima aminada, pode alterar completamente as interações na superfície da enzima.

Figura 3.7 - A análise de SDS-PAGE de diferentes preparações de octil-Lecitase. Experimentos foram realizados como descrito na seção 2. Linha 1: marcadores moleculares, linha 2: suspensão Lecitase comercial, linha 3: octil-Lecitase, linha 4: aminado-octil-Lecitase, linha 5: glutaraldeído-octil-Lecitase, linha 6: aminado octil-Lecitase tratadas com glutaraldeído, linha 7: glutaraldeído-Lecitase tratada com etilenodiamina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando a modificação foi realizada com o glutaraldeído, para a preparação octil-Lecitase aminada, ocorreu o aumento na estabilidade em um fator de 2,5 vezes em pH 9 e não se observou efeito significativo em pH 5 e 7. E isso ocorreu apesar de existir uma intensa reticulação intermolecular (ver **Figura 3.7**). Curiosamente, esta figura mostra que a enzima apenas aminada tem uma mobilidade eletroforética maior do que a enzima não modificada.

Considerando-se que outras enzimas aminadas não demonstraram este comportamento (BARBOSA *et al.*, 2012; GALVIS *et al.*, 2012), esta mobilidade mais elevada poderia estar associada a alguma reticulação intermolecular que evita o desdobramento completo da molécula de enzima (por causa da carbodiimida). No entanto, é difícil garantir isso, mesmo considerando os efeitos estabilizadores encontrados em alguns casos de tratamento por aminação. Na preparação de CNBr Lecitase aminada, ocorreu aumento na estabilidade depois de tratamento com glutaraldeído por um fator de 2 vezes a pH 7, por 6 vezes a pH 5 e de apenas 0,5 vezes a um pH 9.

A aaminação de octil-Lecitase modificada com TNBS, permitiu recuperar, parcialmente, os valores de estabilidade em todos os valores de pH, mas não foi suficiente para eliminar totalmente o efeito negativo do TNBS. A aaminação da preparação de octil-Lecitase com glutaraldeído é positiva a pH 5 (com um fator de 2,5 vezes), e pH 7 (1,8 vezes), e é negativa, a pH 9 (por duas vezes).

Usando CNBr Lecitase, a aaminação da enzima modificada com TNBS produziu uma ligeira estabilização a um pH 7, mas a um pH 5 a estabilidade diminuiu por um fator de quase 2 vezes e também eliminou todos os efeitos positivos da modificação com TNBS em pH 9, de fato, a preparação final é semelhante em termos de estabilidade à preparação não modificada.

Assim, como na atividade, os efeitos da modificação química sobre a estabilidade da enzima dependerá da estratégia de imobilização utilizada e das modificações anteriores realizadas, e não é possível dar qualquer regra geral. Mesmo a reticulação com glutaraldeído nem sempre tem um efeito positivo sobre a estabilidade da enzima.

O glutaraldeído, causou uma reticulação intermolecular, contudo uma reticulação intramolecular não pode ser descartada. Apresentou-se apenas um efeito positivo moderado sobre a estabilidade da enzima em várias condições de inativação (sem fatores de estabilização maiores que 10 vezes), e mesmo em certos casos, o efeito desta modificação foi considerado negativo.

3.4.6 Especificidade das diferentes preparações

A modificação química das enzimas provou ser uma ferramenta para alterar a especificidade da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012). Assim, foi avaliada a atividade das diferentes preparações de enzimas contra alguns substratos a **Tabela 7.3** mostra a atividade das diferentes preparações contra *R* mandelato de metilo e fenilacetato de metilo.

O primeiro ponto a ser observado é que as duas preparações imobilizadas já se mostraram muito diferentes. Enquanto octil-Lecitase é muito mais ativa versus pNPB (ver **Tabela 3.3**), CNBr Lecitase tem 5 (versus fenilacetato de metilo) e 8 vezes mais atividade que a preparação octil (versus *R* mandelato de metilo). A pH 7 e 8,5, a preparação de CNBr apresentou quase a mesma atividade, enquanto que a pH 5, a atividade diminuiu cerca de 6 vezes frente a mandelato de metilo e apenas cerca de 10% frente a fenilacetato de metilo.

Octil-Lecitase tem claramente mais atividade a pH 7 do que a pH 8,5 (a atividade diminui em torno de 20-30%) e a pH 5 (atividade de diminuição de 60%), para ambos os substratos. Esta curva de pH/atividade é completamente diferente àquela encontrada usando pNPB (**Figura 3.3**).

As fortes mudanças na especificidade da lipase e a influência das variáveis experimentais das lipases após imobilização já foram descritos em muitos trabalhos (MATEO *et al.*, 2007). Assim, esperava-se que os biocatalisadores fossem diferentes. No entanto as diferenças são muito maiores do que as normalmente encontradas. Assim, estas diferenças foram consideradas para se analisar o efeito das modificações químicas .

Tabela 3.3 - Atividade de diferentes preparações Lecitase contra diferentes substratos. Os detalhes experimentais podem ser encontrados na Seção 2 RM, *R* metil mandelato; MPA, fenilacetato de metilo. XXX significa atividade muito baixa para ser determinada. A atividade é determinada em U/mg .

BIOCATALISADOR/ pH/ substrato (R/S razão entre atividade)	Modificação química							
	Não modificada	EDA	TNBS	GLUTA	EDA-TNBS	EDA-GLUTA	TNBS-EDA	GLUTA-EDA
Octyl/pH5/R-MM (V_R/V_S)	7.5 ± 0.5 (0.82 ± 0.1)	1.0 ± 0.09 (0.72 ± 0.1)	1.3 ± 0.1 (0.77 ± 0.1)	18.4 ± 1 (4.6 ± 0.4)	2 ± 0.1 (0.38 ± 0.07)	4.8 ± 0.03 (0.74 ± 0.1)	2.2 ± 0.15 (0.77 ± 0.1)	2 ± 0.01 (0.61 ± 0.1)
Octyl/pH7/R-MM (V_R/V_S)	19.7 ± 2 (0.73 ± 0.1)	12.7 ± 1 (0.4 ± 0.07)	2.5 ± 0.1 (0.72 ± 0.1)	3.2 ± 0.2 (1.1 ± 0.1)	3.7 ± 0.1 (0.38 ± 0.05)	23 ± 1 (0.48 ± 0.07)	2.7 ± 0.2 (0.83 ± 0.1)	24 ± 2 (0.71 ± 0.1)
Octyl/pH 8.5/R-MM (V_R/V_S)	13.7 ± 2 (0.68 ± 0.1)	12.1 ± 0.9 (0.37 ± 0.05)	4.8 ± 0.3 (1.2 ± 0.2)	8.7 ± 0.3 (1.3 ± 0.1)	8.6 ± 0.4 (0.52 ± 0.7)	11.6 ± 1 (0.5 ± 0.5)	8.2 ± 1 (0.76 ± 0.15)	7 ± 1 (0.49 ± 0.06)
Octyl/pH5/MPA	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.78 ± 0.05	0.21 ± 0.02	0.7 ± 0.1	0.96 ± 0.07	0.69 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Octyl/pH7/MPA	0.4 ± 0.05	XXX	0.63 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.99 ± 0.1	0.65 ± 0.04	0.57 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Octyl/pH 8.5/MPA	0.22 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.52 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.64 ± 0.05	0.63 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02
CNBr/pH 5/R-MM (V_R/V_S)	24 ± 3 (0.64 ± 0.1)	22.3 ± 1 (0.99 ± 0.1)	10.6 ± 0.5 (0.98 ± 0.1)	36.2 ± 2 (0.7 ± 0.1)	2.1 ± 0.2 (0.38 ± 0.05)	4.8 ± 0.3 (0.41 ± 0.05)	2.2 ± 0.1 (0.52 ± 0.1)	21.2 ± 0.9 (0.55 ± 0.1)
CNBr/pH 7/R-MM (V_R/V_S)	160 ± 10 (0.93 ± 0.1)	22.3 ± 1 (1 ± 0.1)	142.4 ± 12 (0.96 ± 0.1)	125 ± 10 (0.83 ± 0.15)	23.6 ± 2 (0.38 ± 0.04)	17.8 ± 1.5 (0.71 ± 0.5)	25.6 ± 2 (1.3 ± 0.15)	10.9 ± 1 (1.4 ± 0.1)
CNBr/pH 8.5/R-MM (V_R/V_S)	143 ± 10 (1.22 ± 0.15)	19 ± 2 (1.2 ± 0.1)	542 ± 30 (0.96 ± 0.1)	126 ± 13 (0.76 ± 0.1)	26.2 ± 2 (0.52 ± 0.1)	15.1 ± 1.5 (0.9 ± 0.15)	21.5 ± 2 (1.15 ± 0.15)	101.8 ± 3 (1.2 ± 0.1)
CNBr/pH 5/MPA	1.7 ± 0.2	XXX	0.77 ± 0.05	1.83 ± 0.1	1.8 ± 0.2	0.27 ± 0.02	1.51 ± 0.1	1 ± 0.05
CNBr/pH 7/MPA	2.2 ± 0.1	XXX	0.75 ± 0.03	0.62 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.51 ± 0.03	1.43 ± 0.1	1.8 ± 0.08
CNBr/pH 8.5/MPA	2.0 ± 0.15	XXX	0.77 ± 0.04	0.71 ± 0.1	0.71 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.62 ± 0.04	1.6 ± 0.03

Fonte: Elaborada pelo autor.

A aminação da preparação CNBr-Lecitase produziu uma forte diminuição da atividade da enzima a pH 7 e 8,5 versus *R* mandelato de metilo (para 15%), a pH 5, o efeito também é negativo, mas mais limitado (50%). Isto é completamente diferente para o resultado utilizando pNPB, em que o efeito mais negativo era a pH 5 e a pH alcalino, o efeito era ainda positivo.

Usando fenilacetato de metilo, a atividade não foi detectada nas condições experimentais, a qualquer valor de pH (inferior a 1% de hidrólise após 24 h de reação). A aminação do octil-Lecitase aumentou a atividade contra mandelato de metilo em 30% a pH 5 e diminui a pH 7 (em 30%) e pH 8,5 (por apenas 10%). Utilizando como substrato fenilacetato de metilo, a atividade a pH 7 foi tão baixa que não foi possível detectá-la, mas a atividade aumentou em comparação com a enzima não modificada a pH 5 (por um fator de 50%) e ocorreu uma diminuição da atividade a pH 8,5 (em torno de 10%). Novamente, usando pNPB, os resultados foram muito diferentes, com incrementos de atividades em todas as condições.

A Modificação do CNBr-Lecitase com TNBS quase não teve nenhum efeito sobre a atividade enzimática contra metil mandelato a pH 7, enquanto que em pH 5 a atividade diminuiu mais de um fator de 2 vezes e em pH 8,5 a atividade é reduzida em cerca de 30%. Usando fenilacetato de metilo, a pH 7, houve nenhum efeito significativo, enquanto que a pH 8,5 e pH 5 a atividade diminuiu para cerca de 35/45%.

A modificação com TNBS tem um efeito ainda mais negativo em octil-Lecitase sobre a atividade contra o mandelato de metilo, a diminuição da atividade em pH entre 7 e 5 foi por um fator de 6 a 8 vezes, enquanto a pH 8,5 este decréscimo é de 40%. No entanto, usando fenilacetato de metilo, um aumento claro de atividade é observado nos três valores de pH, com um ótimo a pH 5 (aqui o incremento da atividade é por 5 vezes). Mais uma vez, os resultados foram muito diferentes usando pNPB.

A modificação de CNBr-Lecitase com glutaraldeído não produziu um aumento muito relevante, ou uma diminuição na atividade (não mais do que 50%), dependendo do pH e do substrato. Usando a preparação octil-Lecitase, a pH 5 ocorreu diminuição na atividade para 45% utilizando mandelato de metilo, enquanto um aumento de 40%, utilizando-fenilacetato de metilo. A pH 8,5, a atividade para ambos os substratos é reduzida para 60-70%.

A aminação de CNBr Lecitase modificada com TNBS produziu uma diminuição muito significativa da atividade do biocatalisador contra mandelato de metilo, mas

ligeiramente menor do que a aminação da enzima imobilizada não modificada com pH 7 e 8,5 enquanto que o pH 5 a atividade diminuiu para 10%. Usando fenilacetato de metilo como substrato, a um pH de 5 a atividade da enzima modificada com TNBS aumentou após a aminação para se tornar semelhante à da enzima não modificada, enquanto que a pH 7 e 8,5, a atividade diminuiu.

Usando a preparação octil modificada com TNBS, aaminação aumentou a atividade contra mandelato de metilo em 1,7 vezes a pH 5 e 8,5, e apenas por um 10% a um pH de 7, utilizando a atividade frente metil fenilacetato ocorreu ligeira diminuição em toda a gama de valores de pH estudados, com um decréscimo mais elevado a um pH de 8,5 (em 30%).

A aminação de CNBr-Lecitase modificada com glutaraldeído produziu uma ligeira diminuição da atividade contra ambos os substratos. A situação era diferente usando glutaraldeído em octil-Lecitase, quando o uso de metil mandelato promoveu um incremento de 30% da atividade enzimática detectada em pH 7, enquanto a atividade diminuiu em pH 5 e 8,5. No entanto, o uso de fenilacetato de metilo, a atividade aumentou por um fator de 2 a 2,3 vezes após a aminação da enzima modificada.

A modificação com TNBS de CNBr-Lecitase aminado melhorou ligeiramente a atividade contra o mandelato de metilo a pH 7 e 8,5, e tem um efeito muito negativo no pH 5 (por um fator de 6 vezes). Usando fenilacetato de metilo, foi possível detectar novamente a atividade da enzima, e a pH 5 é ainda mais elevada do que a da enzima não modificada.

Octil-Lecitase aminada após modificação com TNBS diminuiu a atividade contra o mandelato de metilo, principalmente, a pH 5 e 7, no entanto, a atividade contra o fenilacetato de metilo aumentou, tornando-se a preparação com octil mais ativa contra este composto, a pH 7 e 8,5 (a pH 5 é igualmente com apenas o biocatalisador modificado com TNBS na segunda posição). A modificação da enzima imobiliza com TNBS proporcionou boa hiperativação contra este substrato.

O tratamento de CNBr-Lecitase aminada com glutaraldeído tem um efeito negativo sobre a atividade da enzima contra mandelato de metilo, para 35% no caso mais drástico (pH 5). Usando mandelato de metilo, a atividade foi detectada novamente, mas com valores mais baixos do que 25% da preparação não modificada.

Usando octil-Lecitase aminada, a situação é bem diferente. A atividade aumenta utilizando mandelato de metilo a pH 7 (por um 80%) e diminuiu a pH 5 (um 50%), enquanto que a pH 8,5, não houve alteração significativa. As alterações mais relevantes são na atividade

contra o éster do ácido fenilacético, agora a atividade é detectável em todas as condições de pHs e o bicatalisador ainda é mais ativo na preparação de octil a pH 5.

3.4.7 *Enantio-especificidade das diferentes preparações*

A **Tabela 7.3** também mostra as razões VR / VS. Como as reações não são de ordem 1, não está diretamente associada à enantioespecificidade, mas ainda é válido para detectar mudanças na atividade da enzima contra diferentes enantioisômeros.

A preparação CNBr-Lecitase tem uma atividade muito semelhante, usando os dois isômeros a um pH7. No, a um pH 5, o isômero *S* foi preferido (0,65) e a pH de 8,5, o isômero *R* foi preferido (1,2). A preparação octil hidrolisou mais rápido o isômero *S* nos valores de pH 5, mas com uma má relação VR / VS (melhores resultados foi de 0,68 a pH 8,5). Assim, ambas as preparações de Lecitase foram quase não enantiosseletiva.

Nestas condições desfavoráveis, a modificação química mostra que algumas melhorias poderiam ser alcançadas mesmo quando usamos uma bateria de modificações. A preparação CNBr-Lecitase melhorou a especificidade para o isômero *S* após aminação e outra modificação com TNBS (0,38) a um pH7, ao passo que a aminação dos derivados modificados com TNBS e glutaraldeído produziram alguma preferência significativa para o isômero *R* (1,3/1,4).

A pH 5, o resultado mais relevante é uma proporção de 4,7 para a enzima modificada com glutaraldeído e de 0,38 para a enzima aminada e modificada com TNBS. Este último teve uma taxa mais significativa a pH 8,5, de 0,5 (enquanto que a enzima não modificada preferiu o isômero *R*). Usando o octil-Lecitase, apenas a enzima aminada a pH 7 (0,4 de razão) e a pH 8,5 (razão de 0,38) melhorou a preferência para com o isômero *S*. A preparação com octil teve apenas uma preferência para o isômero *R*, que é a enzima modificada com TNBS (de 1,2).

3.5 Conclusão

Os resultados apresentados nos experimentos descritos e aludidos até aqui nos mostram que as propriedades de Lecitase podem ser facilmente alteradas através da imobilização ou modificação química. A atividade, especificidade ou estabilidade, mesmo o efeito dos detergentes sobre a atividade da enzima pode ser modulada por estas técnicas. No

entanto, demonstrou-se que a tentativa de estabelecer regras gerais para racionalizar os efeitos é muito complicada, com o conhecimento disponível, o efeito de uma modificação química é muito diferente, dependendo da preparação imobilizada utilizada.

Além disso, o efeito das condições experimentais sobre as características da enzima também são alteradas por meio de imobilização e modificação química: uma alteração nas condições experimentais que têm um efeito positivo sobre a função da enzima em um biocatalisador pode ter um efeito negativo usando outra preparação imobilizada com a mesma modificação.

Assim, imobilização e modificação química parecem ser uma estratégia poderosa para melhorar as propriedades da Lecitase, apesar de atualmente esta ser baseada em um julgamento de uma estratégia-erro, onde os resultados finais são muito improváveis, podem ser positivos se a bateria de biocatalisadores é grande o suficiente (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Capítulo 4

*Tripsina bovina imobilizada em agarose ativada com divinilsulfona:
atividade e estabilidade melhoradas via ligação covalente
multipontual*

4.1 Resumo

A Lecitase Ultra, uma fosfolipase quimérica comercializada pela *Novozyme*, foi imobilizada por meio de duas estratégias diferentes: ligação covalente em brometo de cianogênio-agarose e ativação interfacial em octil-agarose. Posteriormente, as preparações imobilizadas foram submetidas a modificações químicas diferentes (aminação, glutaraldeído ou ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS)), a fim de se verificar o efeito destas modificações nas características catalíticas das enzimas imobilizadas, incluindo assim a estabilidade e especificidade para o substrato em diferentes condições. Pode-se afirmar que a imobilização afeta fortemente as características catalíticas das enzimas: já que octil-Lecitase foi mais ativo contra p-nitrofenilbutirato (p-NPB), mas se apresentou menos ativo frente a fenilacetato de metila que as preparações covalentes. Contudo, os efeitos das modificações químicas dependem fortemente da estratégia de imobilização usada. Por exemplo, o uso de um protocolo de imobilização para duas enzimas promoveu um efeito positivo na atividade, enquanto que para a outra enzima foi negativo. A maior parte das modificações apresentou um efeito positivo nas propriedades da enzima, sob certas condições, embora em certos casos, a modificação apresentou um efeito negativo sob outras condições. Por exemplo, a modificação com glutaraldeído da enzima imobilizada ou modificada e aminada, permitiu melhorar a estabilidade da enzima de ambas as preparações imobilizadas, a pH 7 e 9 (em torno de uma 10 vezes), mas apenas a enzima aminada apresentou melhora na estabilidade em pH5. Apesar de alguma reticulação intermolecular ter sido detectada por meio de SDS-PAGE. A aaminação melhorou a estabilidade de octil-Lecitase, ao mesmo tempo em que reduziu a estabilidade da preparação covalente. A modificação com TNBS só melhorou a estabilidade da enzima da preparação covalente a um pH 9 (por um fator de 10 vezes menor).

Palavras-chave: Imobilização de enzimas. Modificação química de enzima. Estabilização de enzima. Hiperativação de enzima. Glutaraldeído. Ácido 2,4,6- trinitrobenzensulfônico.

4.2 Introdução

As Fosfolipases A1 hidrolisam o grupo 1-acilo de um fosfolipídio a um lisofosfolipido e ácidos graxos livres. Elas são de interesse particular para aplicações industriais, como por exemplo, para produzir lisofosfolipido (bons emulsionantes), glicerol com ácido graxo (ácido eicosapentaenoico, ácido linoleico conjugado e ácido docosa-hexaenoico) e degomagem de óleo (HAVN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006; NA *et al.*, 1990; DEVOS *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2006). Devido às suas aplicações interessantes, novas fosfolipases foram selecionados e descobertas nos últimos anos (HARTMAN *et al.*, 2000; HIGGS *et al.*, 1998; MERINO *et al.*, 1999).

Neste contexto, uma nova preparação enzimática com atividade de fosfolipase A1, ou seja, Lecitase® Ultra, foi patenteada e disponibilizada comercialmente (DE MARIA *et al.*, 2007). Segundo a informação da empresa fornecedora, esta é uma preparação obtida a partir da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum* e desenvolvida principalmente para processos de degomagem (DE MARIA *et al.*, 2007). Esta nova enzima apresenta estabilidade de lipase de *T. lanuginosus* e a atividade de uma enzima de *F. oxysporum* (DE MARIA *et al.*, 2007). Contudo, alguns artigos podem ser encontrados na literatura sobre o uso desta interessante enzima (YANG *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2012; LIU, WANG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2007; WANG, *et al.*, 2010).

Assim neste capítulo serão abordados os estudos sobre os efeitos de diferentes modificações químicas, sobre as diversas características catalíticas de Lecitase. Esta enzima, como as lipases, tem um mecanismo catalítico chamado de ativação interfacial, com uma tampa que cobre o centro ativo do meio homogêneo (forma fechada), em equilíbrio com uma forma onde o centro ativo é exposto ao meio (forma aberta) (MILED *et al.*, 2001; DEREWENDA *et al.*, 1994).

Na presença de superfícies hidrofóbicas, tais como gotas de óleo, a forma aberta da lipase fica adsorvida devido a grande bolsa hidrofóbica formada pela face interna da tampa e os arredores do centro ativo (MILED *et al.*, 2001). Estas mudanças conformacionais dão ao sítio ativo das lipases uma grande flexibilidade, sendo relativamente simples para modular suas propriedades (atividade, seletividade ou especificidade) através de diferentes abordagens, como modificação genética (TURNER *et al.*, 2009; KAUR *et al.*, 2006), engenharia de meio (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2004), mas também ferramentas físico-químicas, como a

imobilização ou a modificação química (MATEO *et al.*, 2007; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Propriedades da Lecitase já foram alteradas via imobilização (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007; CABRERA *et al.*, 2008), mas este é o primeiro estudo sobre os efeitos da modificação química nas suas características catalíticas.

A modificação química foi realizada na Lecitase já imobilizada. Isso simplifica o processo, evita a precipitação da proteína, durante ou depois da modificação, e pode mesmo permitir a pré-estabilização da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2011). Além disso, se a hipótese estiver correta, a imobilização é uma maneira de adaptar a conformação da enzima, pode ser possível que a modificação química de diferentes preparações de enzima possam dar resultados muito diferentes. Alguns estudos utilizando lipase B de *Candida antarctica* parecem confirmar essa possibilidade (BARBOSA *et al.*, 2012).

Considerando a primeira possibilidade, duas estratégias de imobilização muito diferentes foram selecionadas. A primeira delas é a imobilização da enzima através da ativação interfacial em octil-agarose (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998), uma maneira de corrigir a forma aberta da Lecitase, deixando o centro ativo e os grupos em torno dele em um ambiente bastante hidrofóbicas (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

A segunda é a imobilização covalente em gel de agarose ativada com brometo de cianogênio (SCHNAPP *et al.*, 1976). Este método de imobilização foi realizado a um pH de 7 e a uma temperatura de 4°C. Sob estas condições, as possibilidades de ligação covalente multipontual são reduzidas (PEDROCHE *et al.*, 2007) e a enzima irá manter a possibilidade de equilíbrio conformacional entre a forma aberta e fechada (DEREWENDA *et al.*, 1994; MILED *et al.*, 2001). À primeira vista, todos os grupos externos, exceto aqueles envolvidos na imobilização, serão suscetíveis à modificação química.

Neste trabalho, três modificações químicas diferentes foram tentadas. A primeira foi à modificação dos ácidos carboxílicos expostos da enzima com etilenodiamina (EDA), após a ativação com carbodiimida (cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) (CARRAWAY *et al.*, 1972; CARRAWAY *et al.*, 1969). Esta modificação mantém a possibilidade de ionização da superfície da enzima, mas produz uma grande alteração das interações iônicas (quebrando pontes iônicas). Esta modificação de proteínas está bem descrita e tem sido usada para modular as propriedades de lipases - por exemplo, especificidade (RODRIGUES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012 e GALVIS *et al.*, 2012).

O pKa do novo grupo amino é de cerca de 9,2, o que faz com que ele seja mais reativo do que o grupo ϵ -amino de lisina (Lys - pKa 10,7), além disso, a adição de todos os grupos carboxílicos externos é na maior parte da proteína, sendo assim, eles passam a ser 2 a 3 vezes mais, em quantidade, do que grupos Lys externos. No entanto, a modificação não é totalmente específica uma vez que foi descrito que a carbodiimida pode transformar alguns grupos carboxílicos de grupos ureia (caso de ataque de amina e os grupos carboxilo ativados não é suficientemente rápido) e também pode modificar resíduos de tirosina (Tyr). Esta última modificação química pode ser invertida por incubação na presença de hidroxilamina, reobtendo Tyr livre (CARRAWAY *et al.*, 1968).

A segunda modificação fora a de grupos amino primários da superfície da proteína, utilizando 2,3,4-trinitrobenzenosulfonato (TNBS). Esta modificação altamente específica, de grupos amino primários, é tradicionalmente empregue para quantificar esses grupos em proteínas e suportes (SNYDER *et al.*, 1975; MENDES *et al.*, 2011). A modificação dos grupos amino da superfície da enzima vai produzir uma hidrofilação da enzima. Ela vai deixar uma amina secundária com um grupo hidrofóbico pendente nele. Este reagente tem sido utilizado com sucesso para detectar a incidência de resíduos de Lys na função de enzimas e proteínas (JAGTAP *et al.*, 2006). No entanto, poucos estudos têm considerado este reagente como uma maneira de modular as propriedades de enzimas, até onde se sabe apenas descreveu-se esta modificação para: invertase (com moderadamente bons resultados em termos de estabilização) (HUSAIN *et al.*, 1996), α -pancreática suína amilase (alterando a especificidade da enzima) (YAMASHITA *et al.*, 1993) e lipase B de *C. antárctica* (alterando a maioria das características catalíticas) (BARBOSA *et al.*, 2012).

A terceira modificação consistiu no tratamento com glutaraldeído. O glutaraldeído é um reagente utilizado para modificar proteínas; envolvendo principalmente grupos amino primários das proteínas, embora possa eventualmente reagir com outros grupos, por exemplo, tióis, fenóis, e imidazoles. (DARTIGUENAVE *et al.*, 2004; WALT *et al.*, 1994; BARBOSA *et al.*, 2014; HABEEB *et al.*, 1968). Além disso, é um agente de reticulação muito eficaz (BARBOSA *et al.*, 2014; WINE *et al.*, 2007). Uma ligação intermolecular é, de longe, mais difícil de conseguir do que a modificação química de um ponto ou uma reticulação intermolecular. Em uma ligação intermolecular, a distância entre os grupos envolvidos deve coincidir com o comprimento do agente de reticulação e, mesmo se a distância for adequada, requer o correto alinhamento dos dois grupos químicos envolvidos, que estão localizados numa superfície rígida da proteína (RODRIGUES *et al.*, 2011). O grau de modificação de

uma superfície aminada por glutaraldeído pode ser facilmente controlada através da utilização de diferentes concentrações de glutaraldeído, os valores de pH da reação e tempo de reação (MONSAN *et al.*, 1978). Demonstrou-se então, que os grupos amino-glutaraldeído são bastante reativos com outros grupos amino ou glutaraldeído com glutaraldeído livre, sendo, assim, a melhor forma de obter uma reticulação com glutaraldeído (BARBOSA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2013).

A reticulação inter ou intra molecular deve sempre provocar certo aumento de rigidez da enzima (WONG *et al.*, 1992), que pode ou não produzir certa estabilização. Por outro lado, um ponto de modificação química com glutaraldeído pode adicionar um grupo relativamente hidrofóbico (BARBOSA *et al.*, 2012) a partir dos grupos amino da enzima, e que podem afetar muito as propriedades físicas globais da superfície da enzima (por exemplo, hidrofobicidade), alterando também as propriedades catalíticas dela.

Assim, como as modificações com glutaraldeído e TNBS, baseiam-se na reação com os grupos amino primários, eles foram também realizados em enzimas anteriormente aminadas, para maximizar os seus possíveis efeitos, por exemplo, ligações cruzadas inter ou intramoleculares.

A hipótese é que essas modificações químicas podem produzir alterações conformacionais gerais na estrutura da enzima ou alterar os movimentos da tampa, em ambos os casos, ajustando as características finais da enzima. Estas alterações podem ser diferentes, dependendo da estratégia de imobilização usada.

4.3 Materiais e Métodos

Lecitase foi obtida a partir da *Novozymes* (Espanha). Octil-agarose e brometo de cianogênio reticulado 4% (CNBr) foram da *GE Healthcare*. Etilenodiamina (EDA), N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (DEC), ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS), glutaraldeído (solução aquosa a 50%), p-nitrofenil butirato (p-NPB), Triton X-100, dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), *R* e *S* metil mandelato e fenilacetato de metilo foram da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA). Glutaraldeído (25% (v/v) estabilizadas em etanol) foi da *Fluka*. Todos os outros reagentes e solventes eram de grau analítico.

4.3.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada através da hidrólise de uma solução 0,4 mM de p-nitrofenilbutirato (p - NPB) em fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 25 °C (sob estas condições $\epsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para iniciar a reação, 50-100 μL de solução de lipase ou de suspensão foi adicionada a 2,55 mL da solução de substrato. A formação do produto, p-nitrofenol, foi acompanhada em espectrofotômetro a 348 nm.

Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de p-NPB por minuto sob as condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e albumina de soro bovino foi utilizada como referência.

Na determinação dos efeitos do valor do pH sobre a atividade da enzima, o protocolo seguido foi semelhante, mas o tampão nas medições foi alterado de acordo com o valor de pH: de acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 6-8 e borato de sódio a pH 9 e pH 10 a 25 °C, todas as preparações eram inteiramente estáveis após incubação durante várias horas em qualquer um destes valores de pH. Em alguns casos, foram usadas diferentes concentrações de alguns detergentes.

4.3.2 Imobilização de Lecitase em octil agarose

Lecitase foi imobilizada em suportes octil-agarose em baixa força iônica (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007). 2,8 mL de extrato comercial (16 mg de proteína/mL, com uma atividade pNPB de 5,6 /mg de proteína) foi diluído em 67,5 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM a pH 7. Em seguida, adicionaram-se 15 g de octil-agarose úmida. A atividade do sobrenadante e suspensão foram seguidas usando pNPB. Depois da imobilização, a suspensão foi filtrada e a lipase suportada foi lavada várias vezes com água destilada.

4.3.3 Imobilização de Lecitase em CNBr agarose

Um volume de 2,8 mL de Lecitase comercial foi diluída em 67,5 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM contendo 0,05% (m/v) de dodecil sulfato de sódio a pH 7, a 4°C. Em seguida, adicionaram-se 15 g de CNBr. A atividade do sobrenadante e da suspensão foi seguida

usando pNPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte em etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Finalmente, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada em abundância.

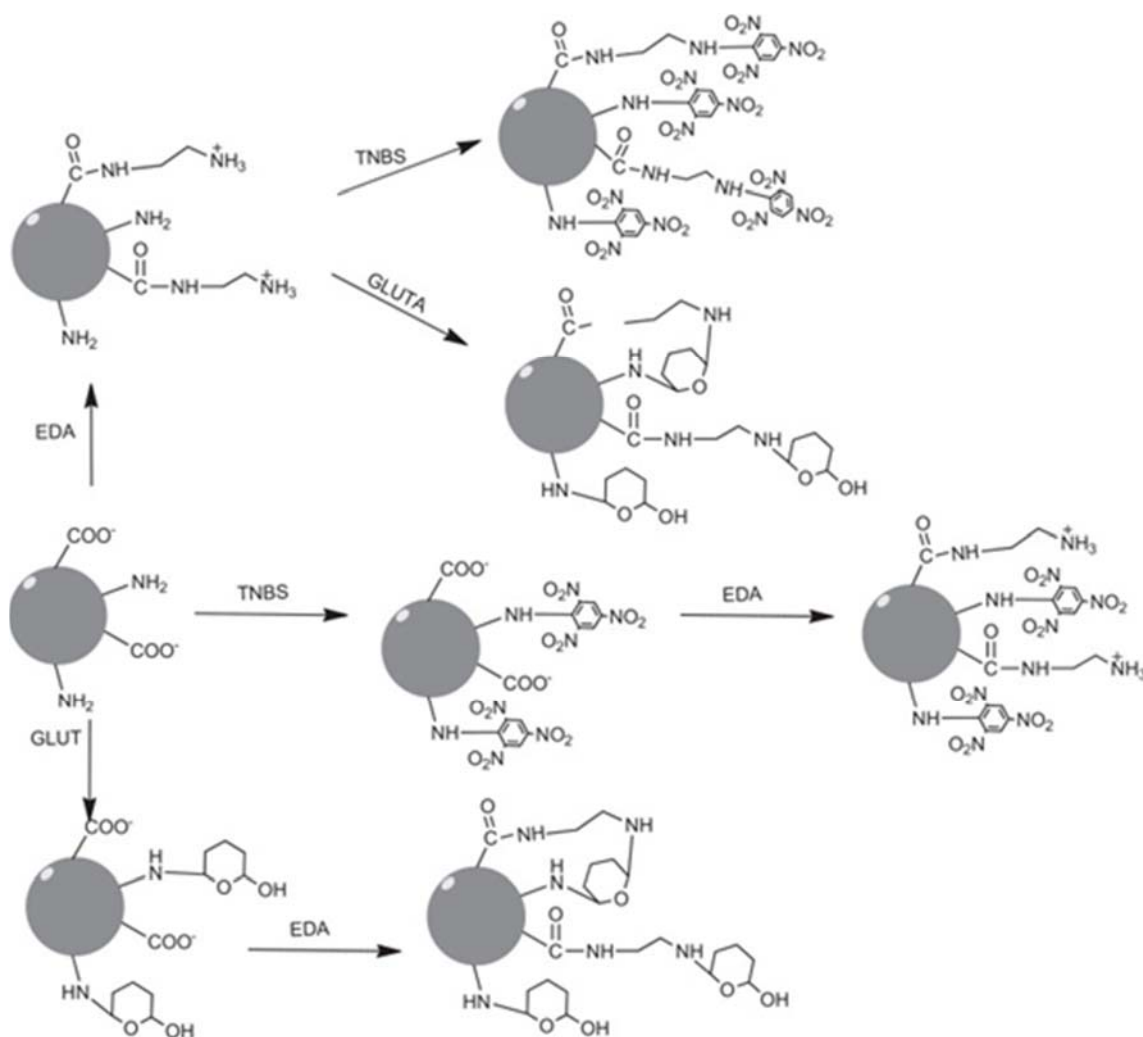
4.3.4 Modificação química de Lecitase imobilizada

A **Figura 4.1** logo mais apresentada, mostra as diferentes modificações químicas realizadas em Lecitase imobilizada e as abreviaturas utilizadas neste estudo.

4.3.4.1 Aminoação em fase sólida de Lecitase

Assim seguindo os dados apresentados na **Figura 4.1**, dez gramas de Lecitase imobilizada, ou Lecitase-TNBS, ou Lecitase-GLU foram adicionadas a 100 mL EDA 1M, a pH 4,75 sob agitação contínua. (GALVIS *et al.*, 2012). A modificação começou com a adição de DEC sólido (para uma concentração final de 10 mM). Após 2 h de agitação suave a 25 °C, os derivados aminados tinham mais do que 95% dos grupos carboxílicos expostos modificados (CARRAWAY *et al.*, 1972; CARRAWAY *et al.*, 1969). Isto foi confirmado através da comparação da cor desenvolvida após titulação com TNBS, que não aumentou utilizando DEC 100 mM ou 2 M EDA. Estas preparações foram lavadas com água destilada e incubadas em 1M de hidroxilamina a pH 8, durante 12 horas para recuperar os resíduos de Tyr, que podem ter sido modificados por DEC (CARRAWAY *et al.*, 1968). Finalmente, as preparações de enzimas imobilizadas foram lavadas com um excesso de água destilada e armazenadas a 4 °C.

Figura 4.1 - Diferentes modificações químicas realizadas neste trabalho. GLUTA: glutaraldeído; TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico; EDA: etilenodiamina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.4.2 Modificação dos grupos amino primários de Lecitase imobilizada com TNBS

De acordo com a **Figura 4.1** ainda, 12 g de Lecitase imobilizada ou Lecitase - EDA foram adicionadas a 100 mL de uma solução de 0,1 % (m/v) TNBS em tampão fosfato de sódio a pH 8,0 e a mistura foi incubada durante 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a preparação de enzima modificada foi lavada com água destilada (BARBOSA *et al.*, 2012). A cor desenvolvida não aumentou, quando uma concentração e volume de TNBS foram dobrados, o que sugere que 100 % dos grupos amino primários expostos na proteína que tinha sido modificada.

Quando este método foi utilizado para determinar a quantidade de grupos amino primários na proteína, 200 mg foram suspensas em uma cubeta contendo 2,2 mL de tampão borato 100 mM, a pH9 e a absorvância a 430nm foi determinada (Barbosa *et al.*, 2012). Como referência, octil-agarose, ou enzima livre bloqueada com CNBr, foi tratada de uma maneira semelhante.

4.3.4.3 Modificação de Lecitase imobilizada com Glutaraldeído

Lecitase imobilizada (**Figura 4.1**) foi incubada com 0,1% (v/v) de solução de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7 e 25 °C durante 1 h, sob agitação suave. Estas condições permitem modificar completamente os grupos amino primários da enzima com apenas uma molécula de glutaraldeído (Barbosa *et al.*, 2012). A suspensão foi então filtrada e lavada com água para remover o excesso de glutaraldeído.

Em seguida, cinco gramas de Lecitase imobilizada e modificada foram adicionadas a 200 mL de tampão borato de sódio 0,1 M contendo 1 mg/mL de NaBH₄, a pH 8,5 e 4 °C; a mistura foi continuamente agitada durante 30 min. Os biocatalisadores reduzidos foram filtrados e lavados várias vezes com água destilada. Este tratamento produziu um decréscimo de 10% na atividade de CNBr-Lecitase, ao mesmo tempo que não apresentou nenhum efeito na atividade das preparações com octil.

4.3.5 Inativação térmica de diferentes Lecitase imobilizado preparações

Para verificar a estabilidade dos derivados de enzimas, 1 g de enzima imobilizada foi suspensa em 5 ml de tampão acetato de sódio 10 mM a pH 5, fosfato de sódio a pH 7 ou carbonato de sódio, a pH 9, a diferentes temperaturas. Periodicamente, foram retiradas amostras e a atividade foi medida usando pNPB. As meias-vidas foram calculadas a partir dos cursos de inativação observados.

4.3.6 Hidrólise de fenilacetato de metila

A atividade enzimática foi determinada usando o fenilacetato de metila; 200 mg das preparações imobilizadas foram adicionadas a 0,2 mL de 5 mM de substrato em tampão 100 mM contendo 50 % de CH₃CN. O tampão foi acetato de sódio a pH5, fosfato de sódio a

pH 7, e carbonato de sódio a pH 8,5. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C, sob agitação contínua. O grau de conversão foi analisado por RP - HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 centímetros).

As amostras (20 µL) foram injetadas e eluídas a um fluxo de 1,0 mL / min, utilizando acetonitrila, uma solução aquosa de acetato de amónio 10 mM (35:65 , v/v) e pH 2,8, como fase móvel, e detecção por UV foi efetuada a 230 nm . Ácido tem um volume de retenção de 3 ml, enquanto o éster tem um volume de retenção de 12 mL. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mol de ácido fenil acético por minuto sob as condições descritas acima. A atividade foi determinada em triplicada, com um máximo de conversão de 20-30%, e os dados são apresentados como valores médios.

4.3.7 Hidrólise de *R* e *S* mandelato de metilo

A atividade enzimática também foi determinada usando *R* ou *S* mandelato de metila. 400 mg das preparações imobilizadas foram adicionadas a 2 ml de substrato 50 mM em tampão acetato de sódio 100 mM a pH 5, 100 mM de fosfato de sódio a pH 7 ou o carbonato de sódio 100 mM a pH 9 e 25 °C, sob agitação contínua.

O grau de conversão foi analisada por RP - HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 centímetros). Amostras (20 µL) foram injetadas e eluídas a um fluxo de 1,0 mL / min utilizando acetonitrila/tampão acetato de amónio 10 mM (35:65 , v/v) a pH 2,8 como fase móvel. A detecção foi realizada em UV a 230 nm. O ácido tem um volume de retenção de 2,5 ml, enquanto o éster tem um volume de retenção de 10 mL. Uma unidade de atividade enzimática, foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido mandélico por minuto sob as condições descritas acima.

A atividade foi determinada em triplicada, com um máximo de conversão de 20-30 % , e os dados são apresentados como valores médios . Como a reação não é de primeira ordem, a 10 mM, *E* não pode ser calculado a partir de velocidade de reação observada usando o os isômeros *R* e *S* (V_R/V_S), e esta relação direta foi utilizada.

4.3.8 Ensaio de SDS-PAGE

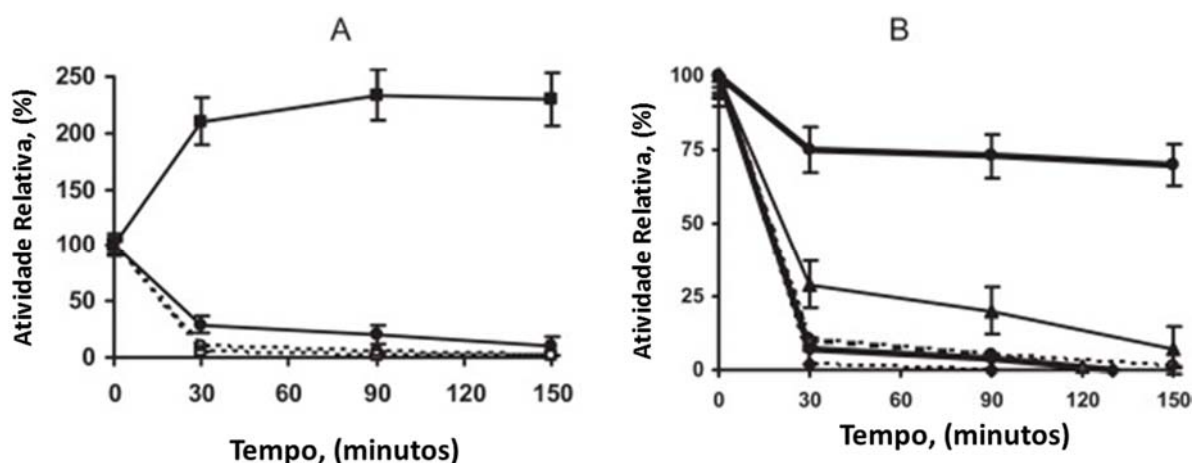
Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli (1970) com uma tetra-célula Miniprotean (Biorad), 12% de gel de corrida de uma zona de separação de 9 cm × 6 cm, e uma zona de concentração de 5% de poliácridamida. Cem miligramas de amostras de enzimas imobilizadas foram suspensas em 1mL de tampão de ruptura (2% de SDS e 10% de mercaptoetanol), fervidas durante 5 minutos e uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi utilizada nas experiências. Os géis foram corados com Azul de Coomassie. Marcadores de baixo peso molecular da marca Fermentas foram usados (10-200 kDa).

4.4 Resultados

4.4.1 Imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr

A **Figura. 4.2A** mostra o curso de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr-agarose.

Figura 4.2 - Cursos de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr. As condições experimentais estão detalhadas na Seção 3.1. (A) Imobilização, na ausência de SDS. Quadrados: octil-agarose; círculos: CNBr-agarose. As linhas sólidas: suspensão, as linhas tracejadas: sobrenadantes. (B) Efeito de SDS sobre os cursos de imobilização de Lecitase em CNBr-agarose. Triângulos: 0,05% SDS (v/v); Losango: SDS a 0,1% (v/v).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em octil-agarose, a maior parte da enzima já está imobilizada depois de 0,5 h, e o aumento da atividade é mais do que um fator de 2 vezes. Quando a imobilização da enzima ocorre em CNBr, esta é rapidamente incorporada no suporte (mais do que 90%), mas a

atividade sofre uma queda drástica (menos do que 5% da atividade inicial é observada no suporte). A inativação da enzima segue próxima a imobilização. Isto é surpreendente, já que as condições de imobilização são muito leves e não se esperava uma reação tão intensa entre enzima/suporte.

Tentando melhorar a recuperação da atividade enzimática em CNBr, foram realizados ensaios com vários detergentes, tentando encontrar um que poderia manter a forma aberta da Lecitase e manter a enzima na forma monomérica (PALOMO *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003), tendo um baixo impacto sobre a sua estabilidade.

Verificou-se que o SDS era o único com um menor efeito sobre a estabilidade da Lecitase. A **Figura 4.2B**, nos possibilita observar que o efeito da presença de diferentes concentrações de SDS sob os valores de atividade durante a imobilização da enzima. A imobilização permaneceu muito elevada uma vez que a atividade residual no sobrenadante foi baixa, e usando 0,05 % de SDS durante a imobilização, em torno de 70% da atividade inicial da enzima depois de 2,5h de imobilização foram recuperados, este resultado se vê na curva da suspensão da figura 4.2B.

Os efeitos do detergente podem ser vários. Por um lado, algumas áreas da enzima podiam ser bloqueadas por este detergente, dessa forma evitando a imobilização por essa área, até mesmo impedir a reação de alguns grupos. Por outro lado, um detergente pode estabilizar a forma aberta da lipase, se o problema depois da imobilização em CNBr é a dificuldade para a abertura da forma da enzima, a imobilização na presença de detergente pode resolver isto (PALOMO *et al.*, 2003). Além disso, se Lecitase tende a formar dímeros (como muitas lipases fazem (PALOMO *et al.*, 2003; PALOMO *et al.*, 2003)), o detergente irá quebrá-los, permitindo assim a imobilização da forma monomérica da enzima. Estas condições de imobilização foram utilizadas como padrão para a preparação dos biocatalisadores utilizados neste trabalho.

4.4.2 Efeito das modificações químicas sobre a atividade da enzima

Ambas as preparações enzimáticas foram submetidos a modificações químicas como fora mostrado na **Figura 4.1**. (pag. XX). O efeito sobre a atividade da enzima em condições padrão pode ser encontrado na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1 - Efeito das modificações químicas sobre as atividades frente a pNPB das diferentes preparações. A atividade foi determinada a pH 7 e 25 °C, tal como indicado no ponto 2. GLUTA, glutaraldeído. A atividade é determinada como U/mg.

Modificação química	Biocatalisador	
	Octil-Lecitase	CNBr-Lecitase
Nenhuma	26 ± 1	0.9 ± 0.05
EDA	35 ± 1	1.1 ± 0.05
TNBS	12.5 ± 0.5	2.4 ± 0.1
GLUTA	18. ± 1	0.54 ± 0.04
EDA-TNBS	20.5 ± 1	0.45 ± 0.03
EDA-GLUTA	16.5 ± 1	0.26 ± 0.02
TNBS-EDA	11.5 ± 0.6	0.32 ± 0.02
GLUTA-EDA	15.2 ± 1	0.4 ± 0.03

Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando octil-Lecitase, a aminação produziu um aumento na atividade da enzima (em cerca de 35%), enquanto que com TNBS (foram cerca de 50% de recuperação da atividade) e com glutaraldeído produziu uma diminuição (cerca de 70%) da atividade da enzima.

A modificação da enzima aminada com TNBS diminuiu a atividade em 40%, ligeiramente menor do que modificando o derivado inalterado de octil-Lecitase, embora agora o número de grupos modificados seja muito maior. O tratamento deste biocatalisador com glutaraldeído reduziu a atividade em cerca de 50%, na verdade, esta modificação reverteu o efeito positivo da aminação e foi menos ativa do que a enzima apenas modificada com glutaraldeído.

Por outro lado, a aminação da enzima modificada com TNBS ou glutaraldeído causou uma ligeira diminuição da atividade enzimática. A situação foi diferente usando a enzima imobilizada covalentemente. Em primeiro lugar, a atividade inicial é muito mais baixa que usando octil-agarose, quase um fator de 30 vezes (medidas agora são realizadas em ausência de detergente).

Aminação produziu uma ligeira melhoria na atividade da enzima, enquanto a modificação com glutaraldeído diminuiu a atividade em 40%. No entanto, a modificação com TNBS aumentou a atividade em mais do que um fator de 2,5 vezes. O glutaraldeído ou

tratamento de TNBS da enzima aminada produziu uma redução severa na atividade da enzima (cerca de 20 e 40% de recuperação da atividade, respectivamente), muito mais expressiva do que utilizando a enzima não modificada.

A aminação da enzima modificada com TNBS produziu a perda de todo o efeito positivo da modificação com TNBS, e até mesmo promoveu uma redução ainda maior na atividade enzimática (atividade caiu 2,5 - 0,32 U/mg). Isto é inesperado, considerando que ambas as modificações independentes têm efeitos positivos sobre a atividade da enzima. A aminação da enzima modificada com glutaraldeído também teve um efeito negativo na atividade, mas não tão negativo. Assim, os efeitos das modificações químicas nas propriedades da enzima dependem fortemente da estratégia de imobilização, e elas não são necessariamente aditivas, em alguns casos, sucessivas modificações tem um impacto menor sobre a atividade da enzima que em cada uma das modificações individuais ou até mesmo efeito oposto.

Considerando-se que para alterar o delicado equilíbrio de forças que estabilizam a forma aberta da lipase, uma explicação específica para cada um dos os resultados individuais pode ser quase impossível. No entanto, as diferenças nas preparações imobilizadas podem ser pelo menos uma explicação parcial para o efeito diferente da modificação química nos derivados de Lecitase imobilizada de forma covalente e adsorção interfacial.

Em Lecitase imobilizada em octil-agarose foi estabilizada a forma aberta, isto significa que qualquer efeito na modificação química fundada sobre as mudanças no equilíbrio aberta/fechada será minimizado agora. Além disso, a área com molécula da enzima imobilizada está em estreito contato com a superfície hidrofóbica do suporte, e este pode alterar a sua reatividade (em alguns casos, pode ser que o grupo não é acessível para a modificação, em outros, alguma partição pode aumentar ou diminuir sua aparente reatividade). Para aumentar a informação sobre o efeito da modificação da atividade da enzima, estudou-se a atividade em pH5 a pH10.

4.4.3 Efeito do pH sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase

A **Figura 4.3** mostra o perfil de atividade das preparações de octil- e CNBr-Lecitase em função do pH. Os perfis são muito diferentes. Embora a enzima imobilizada covalentemente apresente claramente um ótimo de atividade a pH 6 e retenha apenas cerca de

40% de atividade a pH 10, o derivado octil-Lecitase não tem um valor de pH ótimo claro no intervalo estudado, atividade em um plano a partir de pH 8-10, com uma certa tendência para aumentar a atividade até ao valor de pH mais elevado analisado (valores de pH mais elevados apresentavam uma hidrólise química muito rápida do substrato pNPB, o que inviabiliza a correta interpretação dos dados).

Considerando que o derivado octil-Lecitase já está estabilizado, coma forma aberta da enzima, a importância do valor de pH com o derivado de CNBr pode ser uma explicação provável para estes resultados muito diferentes. Em relação ao efeito das modificações químicas em que este perfil, é muito diversificado.

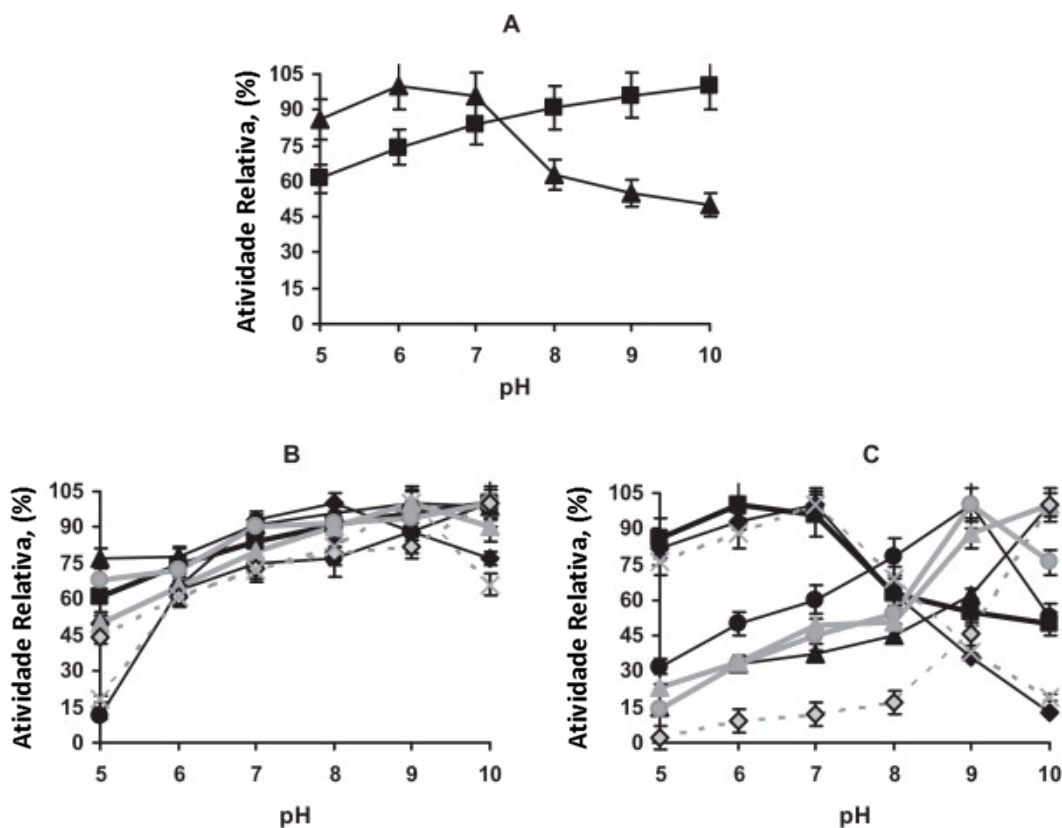
Primeiro, vamos concentrar-nos sobre os derivados com octil (**Figura 7.3B**). A aminação promoveu pouca modificação, uma vez que o perfil permaneceu inalterado. Isso foi muito surpreendente, considerando a mudança radical das interações iônicas comparando a enzima modificada e não modificada, e a mudança dramática que esta modificação química deve produzir sobre a forma como o pH pode afetar essas interações.

A modificação com TNBS ocasionou a diminuição da atividade a valores de pH inferiores a 8 e o efeito é mais significativo a valores de pH ácido (a pH 5 os derivados de octil modificados com TNBS mantiveram apenas 15% da atividade, enquanto o derivado não modificado manteve 61%). A modificação com glutaraldeído produziu um perfil de atividade /pH mais estreito, com uma atividade máxima em pH 8, com uma redução mais significativa da atividade, tanto em valores ácido como em básicos de pH.

A aminação da preparação TNBS-Lecitase promoveu certa recuperação da atividade a valor de pH ácido (cerca de 50 % de retenção da atividade a pH 5). No entanto, o efeito da aminação é claramente negativo para a atividade da preparação modificada com glutaraldeído em valor de pH ácido (ocorre diminuição na atividade de 50 % a 15 % , a pH 5). Nota-se ainda que o pH ótimo da preparação com glutaraldeído muda de 8 a 9.

A modificação com TNBS da enzima aminada tem quase nenhum efeito sobre o perfil de atividade /pH . E a modificação com glutaraldeído da enzima aminada tem um efeito sobre o perfil atividade /pH semelhante a modificação da preparação octil não modificada, mas deixando um valor de pH ótimo claro a pH 9.

Figura 4.3 - Efeito do pH sobre a atividade frente a pNPB das diferentes preparações de Lecitase. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 (A) Efeito do protocolo de imobilização: octil-Lecitase: Quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos. (B) (octil-Lecitase) e (C), (CNBr-Lecitase). Efeito da modificação química. *Uma modificação: linhas pretas sólidas*. Quadrados: Nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, losango: GLUTA. *Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza sólidas*. Círculo cinza: TNBS, Círculo: GLUTA. *Aminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada*. Losango cinza: TNBS, Cruz Cinzenta: GLUTA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A **Figura 4.3C** mostra o efeito das modificações sobre o pH /atividade de Lecitase imobilizada sobre CNBr. Neste caso, as alterações são muito mais evidentes do que quando se utiliza octil-Lecitase. A aminação fez com que a atividade máxima fosse observada no valor mais elevado de pH estudado, o pH 10. Sob estas condições, a atividade absoluta da enzima modificada foi 6 vezes maior do que a da enzima não modificada (0,5 contra 3 U/mg de enzima). No entanto, no pH de 5, a modificação reduziu a atividade da enzima em cerca de um fator de 2 vezes.

A modificação com TNBS provocou uma variação no valor ótimo de pH, de 6 a pH 9 (a este valor de pH da modificação aumentou 8 vezes a atividade enzimática, entre 0,5 e 4 U/ mg). Na faixa de pH ácido, esta diferença é mais curta (por exemplo, a um pH de 5 foi de 0,8 a 1,3). A modificação com glutaraldeído produziu um ligeiro desvio do valor de pH

ótimo (até pH 7), com redução muito significativa da atividade nos valores de pH alcalinos (pH 10 a atividade diminuiu após a modificação de 0,5 a 0,08).

A aminação da enzima modificada com TNBS deslocou para pH 10 a máxima a atividade. Neste valor de pH, a aminação produziu um incremento da atividade da enzima (de 2,1 a 2,6 U/mg), que é cinco vezes maior do que a da enzima não modificada (0,5 U / mg). No entanto, a pHs ácidos, o efeito é muito negativo, a pH 5, por exemplo, a atividade foi de 1,3 a 0,06, mais baixa do que a da enzima apenas aminada (0,8 U/mg). A aminação da Lecitase modificada com glutaraldeído não tem um claro efeito sobre o perfil de atividade em função do pH, apenas um melhor desempenho em valores de pH alcalino (na verdade, as atividades tornam-se idênticas a pH 10).

O tratamento da enzima aminada com TNBS não afetou o valor de pH ótimo; mas a atividade diminuiu em valores de pH mais alcalinos ou ácidos, resultando em uma curva estreita. Usando glutaraldeído na enzima aminada, o perfil de atividade/ em função do pH permaneceu quase inalterado.

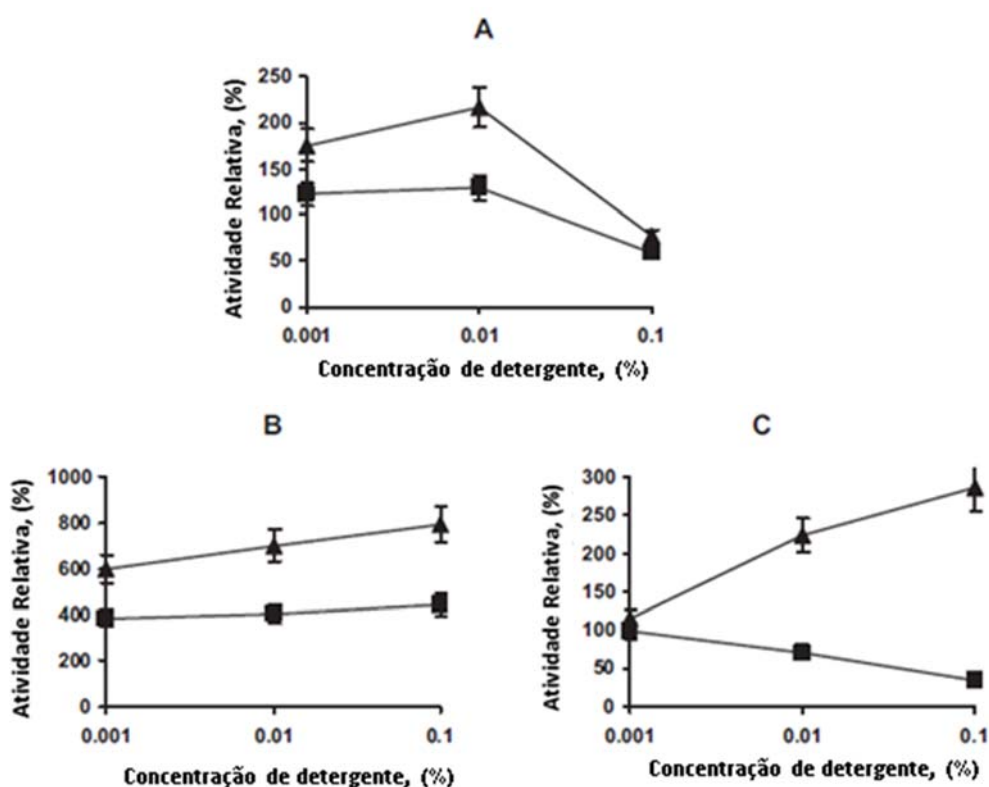
Os resultados obtidos mostram como o efeito de uma modificação química é fortemente dependente do valor de pH, algumas modificações positivas a um valor de pH, podem se tornar muito negativas em outro. O efeito do pH sobre a atividade da enzima depende da estratégia empregada na imobilização; algumas explicações prováveis foram detalhadas anteriormente.

4.4.4 Efeito da presença de detergentes na atividade da enzima

As **Figuras 4.4, 4.5 e 4.6** mostram o efeito da presença de diferentes concentrações de detergentes sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase imobilizada. O efeito do detergente sobre a atividade da enzima pode ser devido a razões diferentes. Em primeiro lugar, pode estabilizar a forma aberta da lipase (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006). Em segundo lugar, o detergente pode alterar a conformação da enzima, gerar sua inativação ou hiperativação, e também produzir uma desestabilização (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007; MOGENSEN *et al.*, 2005). Além disso, o detergente pode atuar como um inibidor competitivo (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Assim, não é provável que para cada preparação enzimática (que esperamos ter uma conformação alterada) o efeito de um detergente pode ser inteiramente diferente, por exemplo, as preparações com octil não pode sofrer ativação por estabilização da enzima pela forma aberta, uma vez que ela já está imobilizada e estabilizada nessa forma (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Figura 4.4 - Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de Lecitase imobilizada. Os experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2. Octil-Lecitase: quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos.



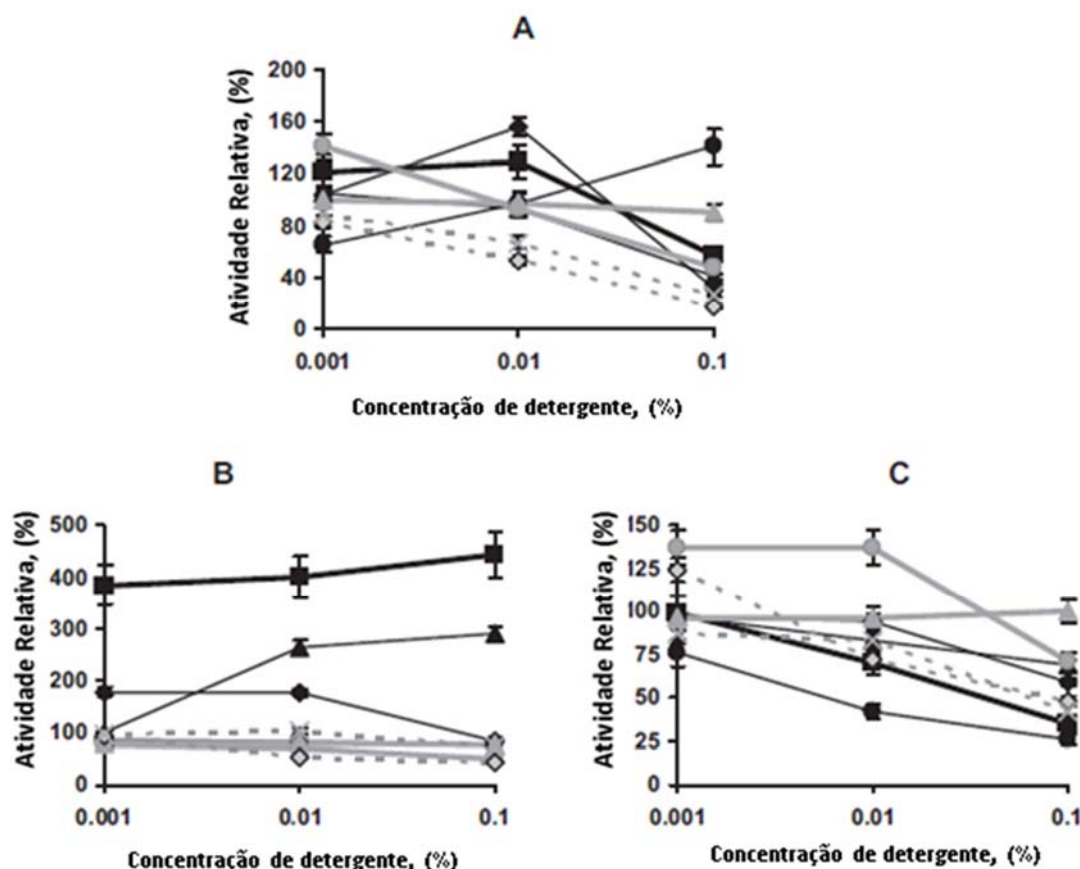
Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando SDS (0,001 a 0,01% (v/v) o derivado octil-Lecitase teve um aumento na atividade (Figura 3.4A) de 120%, enquanto que usando 0,1% de SDS ocorreu diminuição da atividade em 60% (não ocorreu dessorção da enzima utilizando estas concentrações de detergente, concentração de proteína foi determinada usando pelo método de Bradford). Usando CNBr-Lecitase, o incremento da atividade é mais significativo e atinge um máximo

quando usando 0,01% de SDS (mais de 215%), reduzindo para 75% quando se usou 0,1% de detergente.

As diferenças entre as duas preparações imobilizadas seguem a tendência esperada, um efeito maior sobre o CNBr-Lecitase que no octil-Lecitase foi observado. Em seguida, foi analisado se a modificação química pode alterar o efeito do detergente, considerando a sua natureza aniônica.

Figura 4.5 - Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de octil-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 *Uma modificação*: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. *Modificação da Lecitase aminada*: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. Aminação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Começando com as preparações com octil (**Figura 7.5A**), a aminação parece evitar o efeito positivo do SDS na atividade enzimática, e ainda produz uma diminuição na

atividade da enzima em concentrações mais baixas de SDS (por exemplo, a 0,01% (v/v), a atividade está em 90%, enquanto antes era de 120%). A modificação com TNBS provocou um efeito positivo do SDS, foi detectada na maior concentração usada (0,1%), enquanto o tratamento de glutaraldeído não teve quase nenhum efeito sobre o SDS sobre a atividade da enzima.

A aminação da enzima modificada com glutaraldeído elimina os efeitos positivos do SDS na enzima modificado com glutaraldeído, enquanto que a aminação da enzima modificado com TNBS aumenta os efeitos negativos do SDS sobre a enzima modificada com TNBS. O tratamento com glutaraldeído da enzima aminada permitiu manter em torno de 100%, quando utilizando SDS entre 0,001 a 0,1% (v/v), enquanto que o tratamento com TNBS deu como resultado uma atividade enzimática com um comportamento muito semelhante ao da enzima não modificada.

Usando CNBr-Lecitase, os resultados são diferentes (**Figura 7.6A**). A aminação promoveu uma diminuição na atividade da enzima em concentrações mais baixas de SDS; enquanto que a modificação com TNBS causou um efeito positivo com SDS, duplicando a atividade da enzima na máxima quantidade de SDS utilizada neste estudo (0,1%, v/v). A enzima modificada com Glutaraldeído diminuiu progressivamente a atividade para todas as concentrações de SDS analisadas.

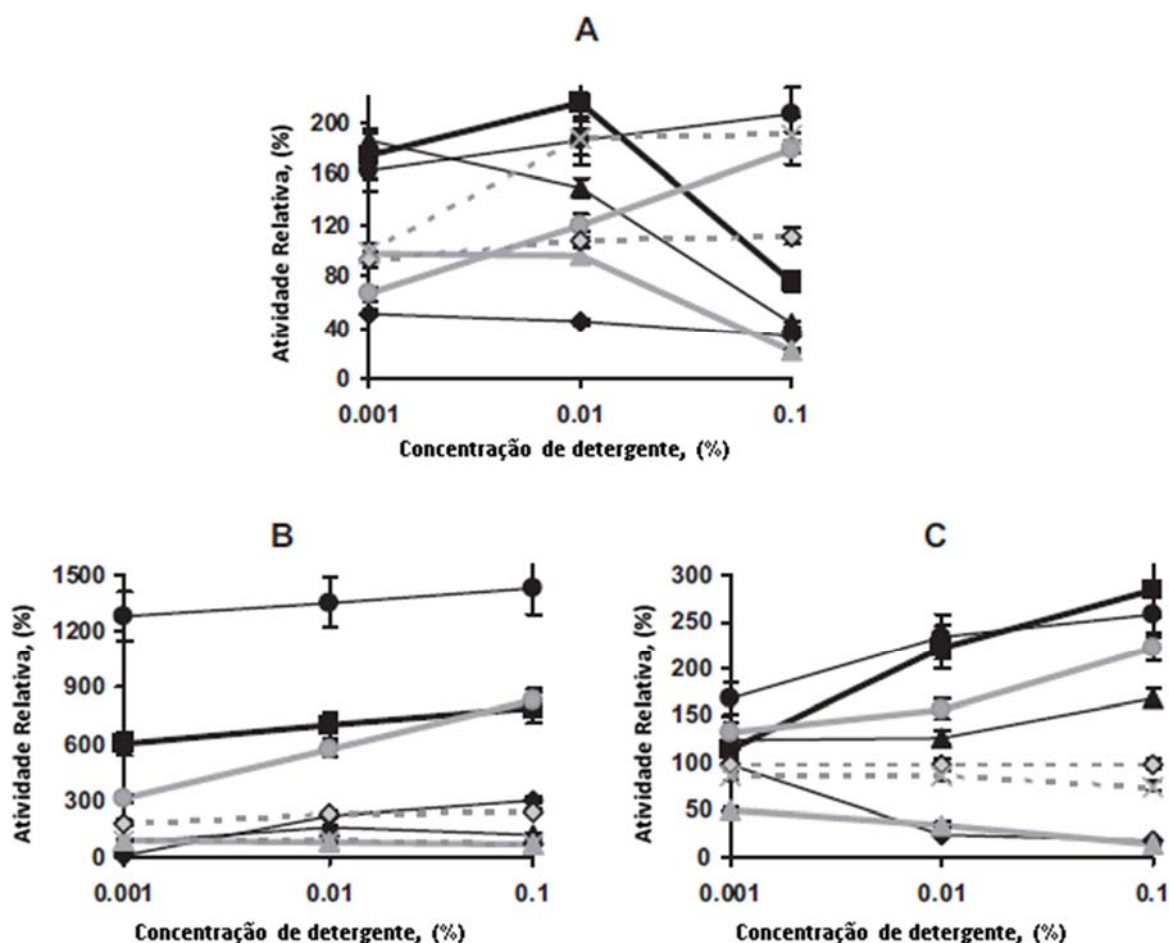
A aminação da enzima modificada com TNBS não apresentou influencia sobre a atividade enzimática pela presença de SDS, contudo quando se usou a enzima modificada com glutaraldeído, a aminação impediu o decréscimo de atividade no intervalo de 0,001 e 0,01 % de SDS, mas não a 0,1%. A modificação com TNBS da enzima aminada teve um efeito semelhante para a mesma alteração na enzima imobilizada e não modificada (atividade máxima foi detectada com SDS a 0,1%), enquanto a modificação com glutaraldeído permitiu melhorar a atividade em elevada concentração de SDS (desde 44 % de aumento de atividade até 190 % usando 0,1 % de SDS).

O CTAB, um detergente catiônico que pode ajudar a compreender os efeitos dos outros detergentes, foi utilizado, embora se tenha verificado que a incubação em longo prazo de soluções de Lecitase com este detergente diminuiu sua atividade. No entanto, em poucos minutos, em geral o tempo para se determinar a atividade, esta inativação é completamente negligenciável na faixa de concentrações estudadas.

Para o octil-Lecitase (Figura 4B), a atividade aumentou para mais de 440% usando 0,1% de CTAB, a concentração máxima utilizada (em que a enzima não foi

encontrada em solução, ou seja não ocorreu dessorção). Usando CNBr, o incremento da atividade chegou a um fator de 8 vezes. Assim, CTAB apresentou um mesmo efeito mais positivo sobre a atividade da enzima em comparação com SDS, utilizando ambas as preparações imobilizadas. Em seguida, analisamos o efeito da modificação química na atividade da enzima na presença de CTAB (Figuras. 3.5B e 3.6B). A maioria das modificações reduziu os efeitos positivos de CTAB sobre a atividade da enzima para ambas as preparações imobilizadas.

Figura 4.6 - Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de CNBr-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 *Uma modificação*: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. *Modificação da Lecitase aminada*: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. *Aminação de Lecitase modificada*: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinza: GLUTA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Usando o derivado aminado de octil-Lecitase (**Figura 4.5B**), o aumento da atividade também foi observado em todas as concentrações de CTAB estudadas, mas com um máximo de 0,1% (v/v) de CTAB o incremento foi de 290%. Contudo, após a modificação com TNBS, a enzima diminuiu progressivamente a sua atividade com o aumento da concentração de CTAB.

A modificação com glutaraldeído, também reduziu os efeitos positivos do CTAB, apenas 85% da atividade inicial foi observada com 0,1% de detergente. A aminação desta preparação quase não tem influência sobre o efeito do detergente, enquanto que, nas preparações com TNBS aminadas ocorreu diminuição da atividade com a concentração de CTAB (para menos de 45% com 0,1% de CTAB, cerca de 7 vezes menor do que enzima imobilizada sem modificação). Ambas as modificações da enzima aminada também eliminaram o efeito positivo do CTAB (**Figura 7.5B**).

Usando a preparação imobilizada de forma covalente (**Figura 7.6B**), a aminação diminuiu fortemente o efeito positivo de CTAB na atividade enzimática, na verdade, a ativação máxima (apenas 160%) se observa com 0,01%, com uma diminuição na atividade da enzima em 0,1% de detergente. A modificação com glutaraldeído reduziu o efeito, mas ainda assim a hiperativação foi significativa e a atividade máxima é obtida em 0,1%.

O resultado mais favorável foi obtido usando TNBS, quando a atividade cresceu progressivamente até chegar a um aumento de 1.500%, considerando que essa preparação já foi 2,5 mais ativas do que a enzima sem modificação, a atividade final com 0,1% CTAB é quase 5 vezes maior ao utilizar esta enzima modificada do que usando a enzima sem modificações (em valores absolutos) foi usada.

A modificação da enzima aminada com TNBS também melhorou significativamente o desempenho da enzima na presença de CTAB, ocorreu uma hiperativação de 8,5 vezes em 0,1% de detergente. Já a modificação com glutaraldeído da enzima aminada em presença de CTAB apresentou um ligeiro efeito negativo sobre a atividade da enzima (mais do que 70% utilizando 0,1% de CTAB, **Figura 4B**).

A aminação da enzima modificada com TNBS produziu uma diminuição na hiperativação provocada pelo CTAB, mas o valor máximo ainda foi observado quando utilizando 0,1% de CTAB. Assim aaminação da enzima modificada com glutaraldeído produziu uma insensibilidade moderada na enzima para com os efeitos do CTAB (uma diminuição progressiva leve na atividade, até atingir 80% utilizando 0,1% de CTAB).

Finalmente, analisou-se o efeito de um detergente não iônico na atividade enzimática das diferentes preparações, Triton X-100 (**Figuras 4.4C, 4.5C e 4.6C**). O derivado octil-Lecitase diminuiu progressivamente a atividade enzimática na presença de Triton (atividade é apenas de 30% em 0,1% de detergente (v /v)) (**Figura 4.4C**). Contudo, com CNBr- Lecitase ocorreu aumento significativo na atividade de maneira progressiva quando Triton foi adicionado ao meio (a hiperativação foi quase de 3 vezes a 0,1% de detergente) (**Figura 4.4C**).

Considerando o uso do octil- Lecitase (**Figura 4.5C**), a aminação reduziu o efeito negativo da presença de detergente sobre a atividade da enzima (70% de atividade em 0,1% de detergente), a modificação com glutaraldeído não teve nenhum efeito sobre a atividade da enzima e somente quando usando 0,1% de detergente produziu uma clara diminuição na atividade da enzimática, enquanto que o TNBS fez que a atividade da enzima diminuísse rapidamente na presença deste detergente, com um 25 % de atividade residual em 0,1% de Triton.

Curiosamente, a aminação desta preparação modificada com TNBS permitiu observar certo aumento da atividade da enzima na presença de baixa concentração de Triton (140%, utilizando 0,001% de detergente), e reduziu os efeitos negativos em concentrações de detergente mais elevadas (50%, quando utilizando 0,1% de detergente) (**Figura 4C**). A aminação da enzima modificada com glutaraldeído teve quase nenhuma influência sobre o efeito do Triton X - 100 na atividade da enzima.

Por outro lado, a modificação com TNBS da enzima aminada permitiu ter certa hiperativação quando usando 0,001 e 0,01 % de detergente (cerca de 1,4 vezes) , mas na presença de 0,1 % de detergente a atividade relativa foi muito semelhante a enzima unicamente aminada . A modificação com glutaraldeído desta enzima aminada, no entanto, permitiu manter a atividade da enzima inalterada em toda a gama de [Triton X - 100] estudada, apresentando maior atividade quando usando 0,1% de detergente (**Figura 4.5C**).

Usando a preparação covalente (**Figura 4.6C**), a aminação permitiu obter um desempenho semelhante na atividade da enzima com baixa concentração de detergente, enquanto a hiperativação em concentrações mais elevadas foi menor. A modificação com glutaraldeído causou uma diminuição drástica na atividade da enzima na presença deste detergente (15 % com 0,1 % de detergente), enquanto a modificação com TNBS quase deixou o efeito desse detergente na atividade enzimática inalterada (**Figura 4.6C**).

A aminação com glutaraldeído da enzima modificada reverteu parcialmente os efeitos muito negativos da modificação com glutaraldeído, enquanto a aminação da enzima modificada com TNBS não produziu nenhum efeito em todas as faixas de concentrações de detergente estudada. A modificação da enzima aminada com TNBS recuperou o efeito do triton sobre a atividade da enzima modificada ou enzima modificada apenas com TNBS, revertendo à ausência do efeito da aminação. No entanto, a modificação com glutaraldeído da enzima aminada aumentou o efeito negativo de Triton X - 100 sobre a atividade da enzima (**Figura 4.6C**).

Os resultados sugerem que os efeitos positivos do detergente podem não estar baseados apenas na estabilização da forma aberta da enzima, mas também em algumas mudanças conformacionais "globais", como a hiperativação apresentada em alguns casos para os derivados com octil, na presença de detergentes, menor do que com os derivados em CNBr mas bastante significativa ainda.

O uso de enzimas enriquecidas com grupos catiônicos ou com grupos mais hidrofóbicos pendent na sua estrutura modifica significativamente o efeito dos detergentes. No entanto, regras não podem ser observadas. Aminação da enzima deveria aumentar o número de moléculas de SDS que interage com a enzima, tornando a interação do detergente catiônico mais difícil. Isto pode produzir efeitos semelhantes usando concentrações muito baixas de SDS, mas exige uma maior quantidade de CTAB.

No entanto, esta tendência não é geralmente observada. A modificação com TNBS deveria produzir um efeito semelhante com todos os detergentes uma vez que novos grupos hidrofóbicos foram introduzidos na enzima. Contudo, em alguns casos esta modificação reduz os efeitos dos detergentes, enquanto em outros produz aumentos sobre a atividade da enzima.

O glutaraldeído deve aumentar a rigidez da enzima (se algumas ligações cruzadas inter- ou intramoleculares são formadas) (BARBOSA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2012), o que pode tornar a enzima menos sensível à ação dos detergentes. No entanto, neste estudo, isto foi observado em alguns casos, enquanto que em outros casos, a modificação com glutaraldeído aumentou principalmente os efeitos negativos frente aos detergentes.

4.4.5 Estabilidade Térmica

A modificação química da superfície da proteína pode produzir algumas alterações inesperadas na estabilidade da enzima (BARBOSA *et al.*, 2012). Aquelas alterações na estabilidade da enzima podem depender das condições da inativação (por exemplo, o valor de pH), principalmente, considerando as mudanças na enzima ionização ou equilíbrio hidrofobicidade/hidrofobilidade (RODRIGUES *et al.*, 2011).

A **Tabela 4.2** mostra a meia-vida das preparações enzimáticas sob diferentes condições. A temperatura foi selecionada de acordo com a estabilidade da enzima, sob os diferentes valores de pH.

Tabela 4.2 - Estabilidade térmica das diferentes preparações de enzimas modificados dadas como meia-vida em minutos. As temperaturas foram 55 °C em pH 7, 53 °C em pH 9 e pH 5 e 49 °C. Outras especificações estão descritas na Seção 2.

Modificação química	Biocatalisador/pH					
	Octil/pH5	Octil/pH7	Octil/pH9	CNBr/pH5	CNBr/pH7	CNBr/pH9
Nenhuma	267 ± 15	48 ± 3	37±3	60±3	63±3	40±3
EDA	406 ± 20	180 ± 10	112±9	60±4	56±3	29±2
TNBS	28 ± 1	22 ± 1	22±12	60±5	30±2	542±30
GLUTA	120 ± 5	154 ±10	511±30	11±1	30±2	42±3
EDA-TNBS	36 ± 1	26 ±1	27 ± 4	311±20	230±20	259±20
EDA-GLUTA	315 ± 10	191 ±10	278 ±15	364±25	120±10	41±4
TNBS-EDA	65 ± 4	34 ±2	37 ±2	34±3	40±3	43±2
GLUTA-EDA	366 ± 20	279 ±20	239 ±15	110±9	44±4	41±3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em pH 7 e 55 °C, a preparação covalente é ligeiramente mais estável do que a imobilizada em octil-Lecitase (meias-vidas de 63 e 48 min), enquanto que a pH 5 e 50 °C, a preparação em octil-agarose é muito mais estável (meias-vidas de 60 e 267 min) e em 53 °C e pH 9, as duas preparações são quase idênticas (cerca de 40 min). Isso já foi verificado com algumas lipases que quando imobilizadas interfacialmente são mais estáveis que quando são imobilizadas via ligação covalente multipontual (PALOMO *et al.*, 2012).

Com isso a preparação com CNBr foi realizada de forma que não favorecesse uma intensa ligação covalente multipontual (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). No entanto, o efeito

da imobilização de Lecitase em octil-agarose não parece tão positivo como para outras lipases, apenas a pH 5, a preparação de octil é claramente mais estável do que a preparação covalente.

A aminação aumentou as meias-vidas em octil-Lecitase (por um fator de 3 a 4 vezes em pHs 7 e 9, e por 1,5 a pH 5), ao passo que a aminação do CNBr-Lecitase não teve nenhum efeito sobre a estabilidade da enzima (por exemplo, pH 7 e 5) ou esse efeito foi ligeiramente negativo (por exemplo, pH 9).

A modificação com TNBS apresentou um efeito muito negativo sobre estabilidade da enzima utilizando o octil-Lecitase, principalmente, a pH 5 (quase um fator de 10 vezes menor). No entanto, a preparação covalente após a modificação com TNBS retirou a estabilidade a pH 5, este tratamento diminuiu por um fator de 2 vezes a pH 7, enquanto a pH 9 foi aumentado por um fator de 12 vezes.

O tratamento com glutaraldeído também produziu resultados mistos sobre a estabilidade da enzima. Octil - Lecitase aumentou a estabilidade por um fator de 15 vezes a pH 9 e por um fator de 3 vezes a pH 7, mas reduziu a estabilidade em 2 vezes a pH 5. Esse efeito de glutaraldeído sobre a estabilidade da enzima pode ser atribuído a uma reticulação intramolecular da enzima.

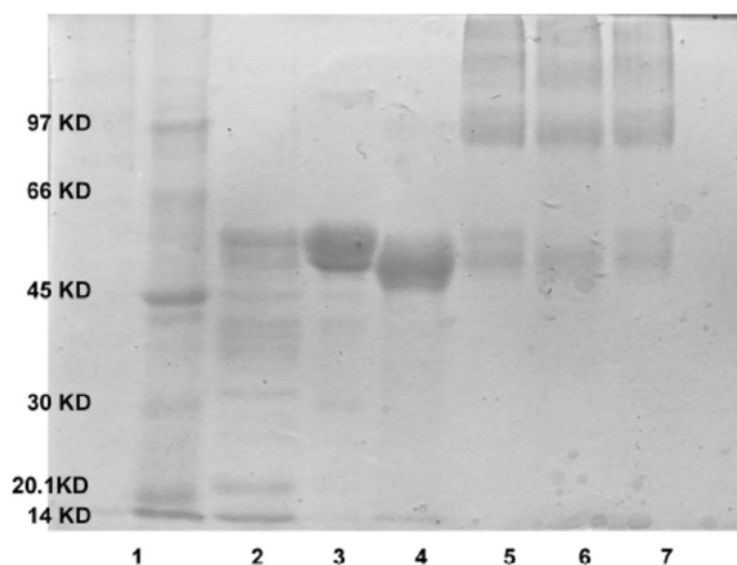
Para verificarmos se pelo menos há alguma reticulação intermolecular, a preparação foi submetida a um SDS-PAGE (**Figura 4.7**), que revelou muitos agregados (bandas proteicas com um peso molecular aparente mais elevada), o que confirma que, pelo menos, muitas moléculas foram intermolecularmente reticuladas covalentemente.

Talvez o efeito negativo da hidrofobização da cadeia Lys (já visualizados após a modificação de TNBS) não poderia ser revertido pelos efeitos positivos da reticulação, e pode ser que muitas ligações cruzadas intermoleculares não tenham sido formadas (a modificação foi muito rápida, de apenas 30 min antes da redução). Usando a preparação de CNBr, a estabilidade não foi alterada pelo tratamento com glutaraldeído a um pH de 9, que diminuíram por um fator de 2 vezes a pH 7, e um aumentou por uma fator de duas vezes a um pH de 5.

A modificação da enzima aminada com TNBS também produziu efeitos diversos. Usando octil-Lecitase aminada, a estabilidade da enzima é reduzida para valores semelhantes aos do TNBS-octil-Lecitase, em todos os valores de pH. No entanto, usando a preparação com CNBr, a estabilidade da enzima aminada aumentou após modificação com TNBS (um fator de 4 a 5 vezes a pH 7 e 5,8 vezes a pH 9), deixando esta enzima duplamente modificada como uma preparação mais estável do que o a enzima não modificada. Isto ocorreu apesar da

modificação ter causado efeito positivo somente quando utilizando a enzima nativa em pH 9. O incremento de moléculas de TNBS incorporadas na enzima, quando utilizando a enzima aminada, pode alterar completamente as interações na superfície da enzima.

Figura 7.7 - A análise de SDS-PAGE de diferentes preparações de octil-Lecitase. Experimentos foram realizados como descrito na seção 2. Linha 1: marcadores moleculares, linha 2: suspensão Lecitase comercial, linha 3: octil-Lecitase, linha 4: aminado-octil-Lecitase, linha 5: glutaraldeído-octil-Lecitase, linha 6: aminado octil-Lecitase tratadas com glutaraldeído, linha 7: glutaraldeído-Lecitase tratada com etilenodiamina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando a modificação foi realizada com o glutaraldeído, para a preparação octil-Lecitase aminada, ocorreu o aumento na estabilidade em um fator de 2,5 vezes em pH 9 e não se observou efeito significativo em pH 5 e 7. E isso ocorreu apesar de existir uma intensa reticulação intermolecular (ver **Figura 7.7**). Curiosamente, esta figura mostra que a enzima apenas aminada tem uma mobilidade eletroforética maior do que a enzima não modificada.

Considerando-se que outras enzimas aminadas não demonstraram este comportamento (BARBOSA *et al.*, 2012; GALVIS *et al.*, 2012), esta mobilidade mais elevada poderia estar associada a alguma reticulação intermolecular que evita o desdobramento completo da molécula de enzima (por causa da carbodiimida). No entanto, é difícil garantir isso, mesmo considerando os efeitos estabilizadores encontrados em alguns casos de tratamento por aminação. Na preparação de CNBr Lecitase aminada, ocorreu aumento na estabilidade depois de tratamento com glutaraldeído por um fator de 2 vezes a pH 7, por 6 vezes a pH 5 e de apenas 0,5 vezes a um pH 9.

A aminação de octil-Lecitase modificada com TNBS, permitiu recuperar, parcialmente, os valores de estabilidade em todos os valores de pH, mas não foi suficiente para eliminar totalmente o efeito negativo do TNBS. A aminação da preparação de octil-Lecitase com glutaraldeído é positiva a pH 5 (com um fator de 2,5 vezes), e pH 7 (1,8 vezes), e é negativa, a pH 9 (por duas vezes).

Usando CNBr Lecitase, a aminação da enzima modificada com TNBS produziu uma ligeira estabilização a um pH 7, mas a um pH 5 a estabilidade diminuiu por um fator de quase 2 vezes e também eliminou todos os efeitos positivos da modificação com TNBS em pH 9, de fato, a preparação final é semelhante em termos de estabilidade à preparação não modificada.

Assim, como na atividade, os efeitos da modificação química sobre a estabilidade da enzima dependerá da estratégia de imobilização utilizada e das modificações anteriores realizadas, e não é possível dar qualquer regra geral. Mesmo a reticulação com glutaraldeído nem sempre tem um efeito positivo sobre a estabilidade da enzima.

O glutaraldeído, causou uma reticulação intermolecular, contudo uma reticulação intramolecular não pode ser descartada. Apresentou-se apenas um efeito positivo moderado sobre a estabilidade da enzima em várias condições de inativação (sem fatores de estabilização maiores que 10 vezes), e mesmo em certos casos, o efeito desta modificação foi considerado negativo.

4.4.6 Especificidade das diferentes preparações

A modificação química das enzimas provou ser uma ferramenta para alterar a especificidade da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012). Assim, foi avaliada a atividade das diferentes preparações de enzimas contra alguns substratos a **Tabela 4.3** mostra a atividade das diferentes preparações contra *R* mandelato de metilo e fenilacetato de metilo.

O primeiro ponto a ser observado é que as duas preparações imobilizadas já se mostraram muito diferentes. Enquanto octil-Lecitase é muito mais ativa versus pNPB (ver **Tabela 4**), CNBr Lecitase tem 5 (versus fenilacetato de metilo) e 8 vezes mais atividade que a preparação octil (versus *R* mandelato de metilo). A pH 7 e 8,5, a preparação de CNBr apresentou quase a mesma atividade, enquanto que a pH 5, a atividade diminuiu cerca de 6 vezes frente a mandelato de metilo e apenas cerca de 10% frente a fenilacetato de metilo.

Octil-Lecitase tem claramente mais atividade a pH 7 do que a pH 8,5 (a atividade diminui em torno de 20-30%) e a pH 5 (atividade de diminuição de 60%), para ambos os substratos. Esta curva de pH/atividade é completamente diferente àquela encontrada usando pNPB (**Figura 4.3**).

As fortes mudanças na especificidade da lipase e a influência das variáveis experimentais das lipases após imobilização já foram descritos em muitos trabalhos (MATEO *et al.*, 2007). Assim, esperava-se que os biocatalisadores fossem diferentes. No entanto as diferenças são muito maiores do que as normalmente encontradas. Assim, estas diferenças foram consideradas para se analisar o efeito das modificações químicas .

Tabela 4.3 - Atividade de diferentes preparações Lecitase contra diferentes substratos. Os detalhes experimentais podem ser encontrados na Seção 2 RM, *R* metil mandelato; MPA, fenilacetato de metilo. XXX significa atividade muito baixa para ser determinada. A atividade é determinada em U/mg .

BIOCATALISADOR/ pH/ substrato (R/S razão entre atividade)	Modificação química							
	Não modificada	EDA	TNBS	GLUTA	EDA-TNBS	EDA-GLUTA	TNBS-EDA	GLUTA-EDA
Octyl/pH5/R-MM (V_R/V_S)	7.5 ± 0.5 (0.82 ± 0.1)	1.0 ± 0.09 (0.72 ± 0.1)	1.3 ± 0.1 (0.77 ± 0.1)	18.4 ± 1 (4.6 ± 0.4)	2 ± 0.1 (0.38 ± 0.07)	4.8 ± 0.03 (0.74 ± 0.1)	2.2 ± 0.15 (0.77 ± 0.1)	2 ± 0.01 (0.61 ± 0.1)
Octyl/pH7/R-MM (V_R/V_S)	19.7 ± 2 (0.73 ± 0.1)	12.7 ± 1 (0.4 ± 0.07)	2.5 ± 0.1 (0.72 ± 0.1)	3.2 ± 0.2 (1.1 ± 0.1)	3.7 ± 0.1 (0.38 ± 0.05)	23 ± 1 (0.48 ± 0.07)	2.7 ± 0.2 (0.83 ± 0.1)	24 ± 2 (0.71 ± 0.1)
Octyl/pH 8.5/R-MM (V_R/V_S)	13.7 ± 2 (0.68 ± 0.1)	12.1 ± 0.9 (0.37 ± 0.05)	4.8 ± 0.3 (1.2 ± 0.2)	8.7 ± 0.3 (1.3 ± 0.1)	8.6 ± 0.4 (0.52 ± 0.7)	11.6 ± 1 (0.5 ± 0.5)	8.2 ± 1 (0.76 ± 0.15)	7 ± 1 (0.49 ± 0.06)
Octyl/pH5/MPA	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.78 ± 0.05	0.21 ± 0.02	0.7 ± 0.1	0.96 ± 0.07	0.69 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Octyl/pH7/MPA	0.4 ± 0.05	XXX	0.63 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.99 ± 0.1	0.65 ± 0.04	0.57 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Octyl/pH 8.5/MPA	0.22 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.52 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.64 ± 0.05	0.63 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02
CNBr/pH 5/R-MM (V_R/V_S)	24 ± 3 (0.64 ± 0.1)	22.3 ± 1 (0.99 ± 0.1)	10.6 ± 0.5 (0.98 ± 0.1)	36.2 ± 2 (0.7 ± 0.1)	2.1 ± 0.2 (0.38 ± 0.05)	4.8 ± 0.3 (0.41 ± 0.05)	2.2 ± 0.1 (0.52 ± 0.1)	21.2 ± 0.9 (0.55 ± 0.1)
CNBr/pH 7/R-MM (V_R/V_S)	160 ± 10 (0.93 ± 0.1)	22.3 ± 1 (1 ± 0.1)	142.4 ± 12 (0.96 ± 0.1)	125 ± 10 (0.83 ± 0.15)	23.6 ± 2 (0.38 ± 0.04)	17.8 ± 1.5 (0.71 ± 0.5)	25.6 ± 2 (1.3 ± 0.15)	10.9 ± 1 (1.4 ± 0.1)
CNBr/pH 8.5/R-MM (V_R/V_S)	143 ± 10 (1.22 ± 0.15)	19 ± 2 (1.2 ± 0.1)	542 ± 30 (0.96 ± 0.1)	126 ± 13 (0.76 ± 0.1)	26.2 ± 2 (0.52 ± 0.1)	15.1 ± 1.5 (0.9 ± 0.15)	21.5 ± 2 (1.15 ± 0.15)	101.8 ± 3 (1.2 ± 0.1)
CNBr/pH 5/MPA	1.7 ± 0.2	XXX	0.77 ± 0.05	1.83 ± 0.1	1.8 ± 0.2	0.27 ± 0.02	1.51 ± 0.1	1 ± 0.05
CNBr/pH 7/MPA	2.2 ± 0.1	XXX	0.75 ± 0.03	0.62 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.51 ± 0.03	1.43 ± 0.1	1.8 ± 0.08
CNBr/pH 8.5/MPA	2.0 ± 0.15	XXX	0.77 ± 0.04	0.71 ± 0.1	0.71 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.62 ± 0.04	1.6 ± 0.03

Fonte: Elaborada pelo autor.

A aaminação da preparação CNBr-Lecitase produziu uma forte diminuição da atividade da enzima a pH 7 e 8,5 versus *R* mandelato de metilo (para 15%), a pH 5, o efeito também é negativo, mas mais limitado (50%). Isto é completamente diferente para o resultado utilizando pNPB, em que o efeito mais negativo era a pH 5 e a pH alcalino, o efeito era ainda positivo.

Usando fenilacetato de metilo, a atividade não foi detectada nas condições experimentais, a qualquer valor de pH (inferior a 1% de hidrólise após 24 h de reação). A aaminação do octil-Lecitase aumentou a atividade contra mandelato de metilo em 30% a pH 5 e diminui a pH 7 (em 30%) e pH 8,5 (por apenas 10%). Utilizando como substrato fenilacetato de metilo, a atividade a pH 7 foi tão baixa que não foi possível detectá-la, mas a atividade aumentou em comparação com a enzima não modificada a pH 5 (por um fator de 50%) e ocorreu uma diminuição da atividade a pH 8,5 (em torno de 10%). Novamente, usando pNPB, os resultados foram muito diferentes, com incrementos de atividades em todas as condições.

A Modificação do CNBr-Lecitase com TNBS quase não teve nenhum efeito sobre a atividade enzimática contra metil mandelato a pH 7, enquanto que em pH 5 a atividade diminuiu mais de um fator de 2 vezes e em pH 8,5 a atividade é reduzida em cerca de 30%. Usando fenilacetato de metilo, a pH 7, houve nenhum efeito significativo, enquanto que a pH 8,5 e pH 5 a atividade diminuiu para cerca de 35/45%.

A modificação com TNBS tem um efeito ainda mais negativo em octil-Lecitase sobre a atividade contra o mandelato de metilo, a diminuição da atividade em pH entre 7 e 5 foi por um fator de 6 a 8 vezes, enquanto a pH 8,5 este decréscimo é de 40%. No entanto, usando fenilacetato de metilo, um aumento claro de atividade é observado nos três valores de pH, com um ótimo a pH 5 (aqui o incremento da atividade é por 5 vezes). Mais uma vez, os resultados foram muito diferentes usando pNPB.

A modificação de CNBr-Lecitase com glutaraldeído não produziu um aumento muito relevante, ou uma diminuição na atividade (não mais do que 50%), dependendo do pH e do substrato. Usando a preparação octil-Lecitase, a pH 5 ocorreu diminuição na atividade para 45% utilizando mandelato de metilo, enquanto um aumento de 40%, utilizando-fenilacetato de metilo. A pH 8,5, a atividade para ambos os substratos é reduzida para 60-70%.

A aaminação de CNBr Lecitase modificada com TNBS produziu uma diminuição muito significativa da atividade do biocatalisador contra mandelato de metilo, mas

ligeiramente menor do que a aminação da enzima imobilizada não modificada com pH 7 e 8,5 enquanto que o pH 5 a atividade diminuiu para 10%. Usando fenilacetato de metilo como substrato, a um pH de 5 a atividade da enzima modificada com TNBS aumentou após a aminação para se tornar semelhante à da enzima não modificada, enquanto que a pH 7 e 8,5, a atividade diminuiu.

Usando a preparação octil modificada com TNBS, aminação aumentou a atividade contra mandelato de metilo em 1,7 vezes a pH 5 e 8,5, e apenas por um 10% a um pH de 7, utilizando a atividade frente metil fenilacetato ocorreu ligeira diminuição em toda a gama de valores de pH estudados, com um decréscimo mais elevado a um pH de 8,5 (em 30%).

A aminação de CNBr-Lecitase modificada com glutaraldeído produziu uma ligeira diminuição da atividade contra ambos os substratos. A situação era diferente usando glutaraldeído em octil-Lecitase, quando o uso de metil mandelato promoveu um incremento de 30% da atividade enzimática detectada em pH 7, enquanto a atividade diminuiu em pH 5 e 8,5. No entanto, o uso de fenilacetato de metilo, a atividade aumentou por um fator de 2 a 2,3 vezes após a aminação da enzima modificada.

A modificação com TNBS de CNBr-Lecitase aminado melhorou ligeiramente a atividade contra o mandelato de metilo a pH 7 e 8,5, e tem um efeito muito negativo no pH 5 (por um fator de 6 vezes). Usando fenilacetato de metilo, foi possível detectar novamente a atividade da enzima, e a pH 5 é ainda mais elevada do que a da enzima não modificada.

Octil-Lecitase aminada após modificação com TNBS diminuiu a atividade contra o mandelato de metilo, principalmente, a pH 5 e 7, no entanto, a atividade contra o fenilacetato de metilo aumentou, tornando-se a preparação com octil mais ativa contra este composto, a pH 7 e 8,5 (a pH 5 é igualmente com apenas o biocatalisador modificado com TNBS na segunda posição). A modificação da enzima imobilizada com TNBS proporcionou boa hiperativação contra este substrato.

O tratamento de CNBr-Lecitase aminada com glutaraldeído tem um efeito negativo sobre a atividade da enzima contra mandelato de metilo, para 35% no caso mais drástico (pH 5). Usando mandelato de metilo, a atividade foi detectada novamente, mas com valores mais baixos do que 25% da preparação não modificada.

Usando octil-Lecitase aminada, a situação é bem diferente. A atividade aumenta utilizando mandelato de metilo a pH 7 (por um 80%) e diminuiu a pH 5 (um 50%), enquanto que a pH 8,5, não houve alteração significativa. As alterações mais relevantes são na atividade

contra o éster do ácido fenilacético, agora a atividade é detectável em todas as condições de pHs e o bicatalisador ainda é mais ativo na preparação de octil a pH 5.

4.4.7 *Enantio-especificidade das diferentes preparações*

A **Tabela 4.3** também mostra as razões VR / VS. Como as reações não são de ordem 1, não está diretamente associada à enantioespecificidade, mas ainda é válido para detectar mudanças na atividade da enzima contra diferentes enantioisômeros.

A preparação CNBr-Lecitase tem uma atividade muito semelhante, usando os dois isômeros a um pH7. No, a um pH 5, o isômero *S* foi preferido (0,65) e a pH de 8,5, o isômero *R* foi preferido (1,2). A preparação octil hidrolisou mais rápido o isômero *S* nos valores de pH 5, mas com uma má relação VR / VS (melhores resultados foi de 0,68 a pH 8,5). Assim, ambas as preparações de Lecitase foram quase não enantiosseletiva.

Nestas condições desfavoráveis, a modificação química mostra que algumas melhorias poderiam ser alcançadas mesmo quando usamos uma bateria de modificações. A preparação CNBr-Lecitase melhorou a especificidade para o isômero *S* após aminação e outra modificação com TNBS (0,38) a um pH7, ao passo que a aminação dos derivados modificados com TNBS e glutaraldeído produziram alguma preferência significativa para o isômero *R* (1,3/1,4).

A pH 5, o resultado mais relevante é uma proporção de 4,7 para a enzima modificada com glutaraldeído e de 0,38 para a enzima aminada e modificada com TNBS. Este último teve uma taxa mais significativa a pH 8,5, de 0,5 (enquanto que a enzima não modificada preferiu o isômero *R*). Usando o octil-Lecitase, apenas a enzima aminada a pH 7 (0,4 de razão) e a pH 8,5 (razão de 0,38) melhorou a preferência para com o isômero *S*. A preparação com octil teve apenas uma preferência para o isômero *R*, que é a enzima modificada com TNBS (de 1,2).

4.5 Conclusão

Os resultados apresentados nos experimentos descritos e aludidos até aqui nos mostram que as propriedades de Lecitase podem ser facilmente alteradas através da imobilização ou modificação química. A atividade, especificidade ou estabilidade, mesmo o efeito dos detergentes sobre a atividade da enzima pode ser modulada por estas técnicas. No

entanto, demonstrou-se que a tentativa de estabelecer regras gerais para racionalizar os efeitos é muito complicada, com o conhecimento disponível, o efeito de uma modificação química é muito diferente, dependendo da preparação imobilizada utilizada.

Além disso, o efeito das condições experimentais sobre as características da enzima também são alteradas por meio de imobilização e modificação química: uma alteração nas condições experimentais que têm um efeito positivo sobre a função da enzima em um biocatalisador pode ter um efeito negativo usando outra preparação imobilizada com a mesma modificação.

Assim, imobilização e modificação química parecem ser uma estratégia poderosa para melhorar as propriedades da Lecitase, apesar de atualmente esta ser baseada em um julgamento de uma estratégia-erro, onde os resultados finais são muito improváveis, podem ser positivos se a bateria de biocatalisadores é grande o suficiente (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Capítulo 5

Avaliação da agarose ativada com divinilsulfona para imobilizar lipases e melhorar suas propriedades catalíticas

5.1. Resumo

Lecitase Ultra foi imobilizada covalentemente em brometo de cianogênio agarose (CNBr) reticulada 4%, mantendo 70% da atividade inicial. A atividade da enzima imobilizada foi melhorada na presença de Triton X-100, dodecil-sulfato de sódio (SDS), e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (por exemplo, em até 800% quando CTAB foi utilizado). No entanto, CTAB e Triton X-100 apresentaram um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima, mesmo em baixas concentrações, e SDS não pode ser utilizado por um longo tempo na concentração de 1%. Para manter a conformação hiperativada da enzima na ausência de detergente, polímeros iônicos foram adicionados durante a incubação da enzima imobilizada na presença de detergentes. O revestimento da enzima imobilizada com polietilenimina (PEI) em tampão aquoso produziu um aumento de 3 vezes na atividade da enzima. No entanto, na presença de SDS a 0,1% (v/v), este revestimento produziu um aumento de 50 vezes na atividade da enzima. Usando PEI e 0,01% (v/v) de CTAB, a atividade Lecitase diminuiu para 10%. Usando inibidores irreversíveis, pode ser demonstrado que a preparação PEI/SDS-CNBr-Lecitase permitiu que seu sítio catalítico *Ser* (serina) ser mais acessível ao meio de reação que a preparação CNBr-Lecitase não modificada.

Palavras-chave: Lecitase. Hiperativação de enzima. Detergente. PEI. Modificação física em fase sólida. *Bioimprinting*.

5.2 Introdução

A melhoria da atividade da enzima é um dos alvos mais interessantes na produção de um biocatalisador. Este aumento de atividade é conseguido ao modificar a enzima utilizando diversas ferramentas, tais como mutagênese dirigida local (DUAN *et al.*, 2013), evolução dirigida (STEFFLER *et al.*, 2013; TURNER, 2009) a modificação química (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011), entre outros.

No entanto, deve considerar-se que, na maioria dos casos, as enzimas são utilizadas, em escala industrial, de uma forma imobilizada, para permitir a sua reutilização (se a enzima imobilizada é suficientemente estável). (DICOSIMO *et al.*, 2013; LIESE *et al.*, 2013). Assim, pode ser interessante para o desenvolvimento de estratégias que objetivam melhorar a atividade da enzima durante a preparação do biocatalisador, serem compatível com a estratégia de melhorar diretamente o desempenho da enzima através de ferramentas genéticas (RODRIGUES *et al.*, 2011; HERNANDEZ *et al.*, 2011).

A imobilização é, em muitos casos, associada a um decréscimo na atividade enzimática, por várias razões, por exemplo, a distorção da enzima, os problemas de difusão, problemas estéricos. No entanto, um protocolo de imobilização adequado pode manter, ou mesmo aumentar, a atividade da enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A melhoria da atividade pode ser encontrada em alguns casos, impedindo algumas das razões para a redução da atividade da enzima, tal como a inibição ou a distorção, enquanto em outros casos, através da produção de uma enzima conformação mais ativa. (RODRIGUES *et al.*, 2013)

As lipases têm um mecanismo catalítico chamado ativação interfacial. (VERGER *et al.*, 1997; BERG *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2009). O centro ativo é isolado, a partir do meio de reação, através de uma cadeia de oligopéptidos, chamada "aba" ou "tampa" (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991; TILBEURGH *et al.*, 1993).

A face interna da tampa é hidrofóbica e interage com os domínios hidrofóbicos que rodeiam o centro ativo. Esta tampa pode ser movida para fora expondo este bolso muito hidrofóbico para o meio. Esta conformação é instável em meio aquoso, fazendo com que as moléculas de enzima estejam na conformação "fechada", ou seja, sem atividade a maior parte do tempo. Na presença do seu substrato natural (uma gota de óleo), a bolsa hidrofóbica permite a adsorção da enzima sobre a sua superfície, a estabilização da conformação aberta e ativa da lipase, permitindo que a lipase para atuar na interface da gota de óleo e o sistema aquoso.

As lipases também têm sido hiperativada durante a preparação de biocatalisadores, usando condições nas quais a estrutura da enzima encontra-se aberta e capaz de ser ainda mais estabilizada nesta conformação. Nestes casos, a conformação aberta, tem sido tipicamente produzida utilizando detergentes; essas moléculas anfipáticas estabiliza a conformação aberta das lipases (GUNCHEVA *et al.*, 2007; HELISTÖ *et al.*, 1998), mas também pode atuar como inibidores (GARGOURI *et al.*, 1983), levando à sua inativação (MOGENSEN *et al.*, 2005; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Assim, as lipases têm sido liofilizadas (MINGARRO *et al.*, 1995), onde precipitou reticulado (LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2002), ionicamente adsorvido (FILICE *et al.*, 2011), ou reticulada com glutaraldeído (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006) na presença de detergentes para permitir a congelação da forma aberta, de modo que a conformação ativa e aberta irá persistir após o detergente ser eliminado.

Além disso, o revestimento físico em fase sólida de enzimas com polímeros iônicos é declaradamente um método bastante simples e rápido para a modificação da atividade da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2011). Este revestimento com polímeros iônicos tem sido proposto como um meio para melhorar a estabilidade da enzima, sob certas condições. (BRYJAK *et al.*, 1995). Por exemplo, a presença de solventes orgânicos ou de oxigênio por segregar estes reagentes hidrofóbicos a partir do ambiente da enzima (MATEO *et al.*, 2006; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1999), impedindo assim dissociação da enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2013). Em alguns casos, o revestimento de polímero de lipases foi reportado para melhorar o comportamento catalítico da enzima (por exemplo, a especificidade) (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2012; CABRERA *et al.*, 2010; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2009).

Lecitase Ultra é uma fosfolipase A1 comercial desenvolvida principalmente para os processos de degomagem (DE MARIA *et al.*, 2007), apesar de fosfolipases A1 poderem ter diferentes usos. (HAVN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006; NA *et al.*, 1990; DEVOS *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2006). Esta enzima tem sido obtida a partir da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, para conseguir uma boa estabilidade, e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum*, para obter a atividade da fosfolipase. (DE MARIA *et al.*, 2007)).

Com isso a enzima tem sido encontrada por se comportar como uma lipase padrão, com a capacidade de ser adsorvida nas superfícies hidrofóbicas, por exemplo, suportes hidrófobos (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007) e por apresentar uma ampla especificidade (YANG *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2013; LIU *et al.*,

2012a; LIU *et al.*, 2012b; LIU *et al.*, 2012c; MISHRA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010 e WANG *et al.*, 2011).

Assim, na atividade de pesquisa realizada, tentou-se obter a conformação aberta estabilizada de Lecitase Ultra, imobilizada em brometo de cianogênio agarose por ligação covalente, via modificação física com polímeros iônicos, “através de reticulação iônica” após a ativação por detergentes.

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 Materiais

A Lecitase foi doada pela Novozymes (Espanha), cerca de 16 mg de proteína/ mL, com uma atividade em pNPB de 5,6 U/mg de proteína. Brometo de cianogênio reticulado 4% (CNBr) foi obtido da GE Healthcare (Pollards Wood, UK). A Polietilenoimina (PEI ramificada, Mn de 10.000, Mw 25.000 Da), o dextrano sulfato (DS, médio Mw, 9000-20000 Da), p-nitrofenil butirato (p-NPB), o Triton X-100, o dodecil sulfato de sódio (SDS), o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e éter p-nitrofenilfosfato (D-pNPP) foram advindos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

5.3.2 Determinação da atividade enzimática

Este ensaio foi realizado através da medição do aumento da absorvância a 348nm produzidos pelo p-nitrofenol libertado na hidrólise de 0,4mM de p-nitrofenilbutirato (p - NPB) em fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 25 °C (sob estas condições $\varepsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para iniciar a reação, 50-100µl de solução de lipase ou de suspensão foi adicionada a 2,55mL da solução de substrato. Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de p-NPB por minuto sob as condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, *et al.*, 1976) e albumina de soro bovino foi utilizada como referência.

5.3.3 Imobilização de Lecitase em CNBr agarose

Um volume de 2,8 mL de Lecitase comercial foi diluída em 67,5 ml de fosfato de sódio 5mM contendo 0,05% (m/v) de dodecil sulfato de sódio a pH7, a 4°C. Em seguida, foi adicionado 15 g de CNBr. A atividade do sobrenadante e a suspensão foram seguidas usando pNPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte com etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Finalmente, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada abundante. O rendimento de imobilização foi superior a 90% e atividade expressa de 70%. (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014).

5.3.4 Revestimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos

O protocolo seguido foi previamente otimizado para o revestimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos (SANTOS, *et al.*, 2014). Em que 10g de Lecitase imobilizada foram adicionados a 100 mL de PEI a um pH de 7 ou DS a pH 5 (1 mg/mL). Em alguns casos, o detergente, para a concentração desejada, foi adicionado 2 minutos antes da adição do polímero, mantendo-se esta mistura, sob suave agitação, durante um período máximo de 24 horas. A atividade foi seguida durante incubação, de acordo com o protocolo de atividade descrito acima com p-NPB.

5.3.5 Análise do efeito dos detergentes sobre a estabilidade de CNBr-Lecitase

Para verificar a estabilidade dos derivados de enzimas na presença de detergentes, 1g de enzima imobilizada foi suspenso em 5 mL de fosfato de sódio 10 mM a pH 7, a 25 °C. Periodicamente, foram retiradas amostras, e a atividade foi medida usando pNPB. Uma suspensão de CNBr-Lecitase na ausência de detergente foi utilizado como uma referência. O valor de atividade obtido utilizando a suspensão de referência, e adicionando à mistura de reação a quantidade equivalente de detergente em cada amostra (para distinguir efeitos de ativação / inibição do detergente presente nas suspensões problemáticas) foi tomada como 100% de atividade.

5.3.6 Inativação irreversível de Lecitase imobilizada na presença de D-pNPP

Diferentes preparações imobilizadas-lipase (0,8 g) foram suspensas em 5 mL de solução tampão de fosfato de sódio 100mM a pH7 em 25 °C. Em seguida, a D-pNPP foi adicionado até uma concentração de 1mM. Amostras desta suspensão foram retiradas periodicamente, e suas atividades foram verificadas utilizando como ensaio p-NPB.

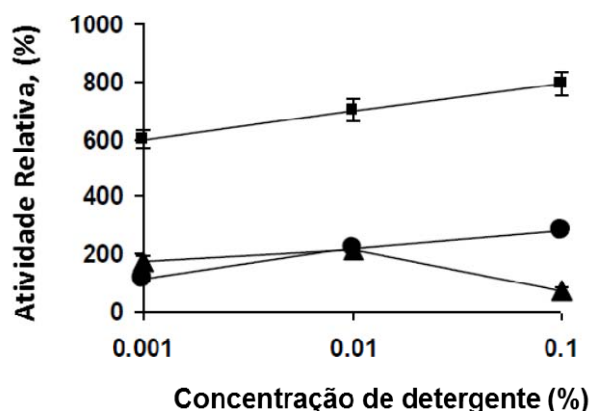
5.4 Resultados

5.4.1 Efeito do detergente nas propriedades da enzima

Três detergentes com características diferentes foram testados: CTAB, um surfactante catiônico; SDS, um agente tensoativo aniônico; e Triton X-100, um surfactante não iônico. A Figura 9.1 (p.XX) mostra os efeitos sobre a atividade enzimática de cada detergente. Na gama de concentrações estudadas, CNBr-Lecitase foi hiperativada na maioria dos casos. A maior hiperativação foi detectada usando CTAB (quase 8 vezes), e o efeito aumentou junto ao aumento da concentração de detergente. SDS teve um efeito positivo em baixas concentrações (aumentar o aumento da atividade por dupla em 0,01%). No entanto, a 0,1% de SDS, a atividade foi menor do que na ausência de SDS. Triton X-100 mostrou um efeito menor sobre a atividade da enzima em concentrações de detergente baixas, mas a 0,1%, a atividade foi quase três vezes maior do que o controle.

Além disso, a preparação enzimática foi incubada na presença destes detergentes para verificar o seu efeito sobre a estabilidade da enzima (Tabela 9.1). Utilizando 0,1% de SDS, a atividade enzimática observada depois de 24 h foi de quase 100%, enquanto que com 0,1 % de Triton X-100, a atividade diminuiu lentamente, e com CTAB, a atividade diminuiu rapidamente. A atividade recuperada após 24 horas foi de 80% utilizando Triton X-100, e 10% usando CTAB. A atividade recuperada foi maior quando foi utilizada uma concentração de 0,01% para ambos detergentes.

Figura 5.1- Efeito dos detergentes na atividade da Lecitase imobilizada. Atividade foi determinada utilizando pNPB como indicado na seção de métodos. Triângulos: SDS, quadrados: CTAB, Círculos: Triton X-100.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora os três detergentes apresentassem efeitos positivos sobre a atividade da enzima, sua presença na solução tinha um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima; o efeito foi mais significativo com o detergente mais hiperativante (CTAB). Usando SDS, foi observado um maior efeito de hiperativação quando utilizando uma concentração máxima de até 0,1% desse detergente, no entanto a concentração máxima que pode ser utilizada por um período de tempo prolongado foi de 0,01%.

Tabela 5.1- Efeito da presença de detergentes na atividade de CNBr-Lecitase. CNBr-Lecitase foi incubado a pH 7 e 25°C em 25mM de fosfato de sódio com concentração indicada de detergente, durante 24 h. Em seguida, as preparações foram lavadas e a atividade do biocatalisador foi medida utilizando pNPB (ver métodos). * 100 é a atividade inicial do biocatalisador.

Detergente	Concentração (%), (v/v)	Atividade recuperada(%)*
Ausente	-	100
Triton X-100	0.1	60±3
Triton X-100	0.01	80±3
SDS 0.1	0.1	100±5
SDS 0.01	0.01	100±4
CTAB	0.1	>10
CTAB	0.01	60±2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os efeitos positivos dos detergentes sobre a atividade da lipase é o mais provável, ao menos parcialmente, devido à estabilização da conformação aberta da enzima, embora

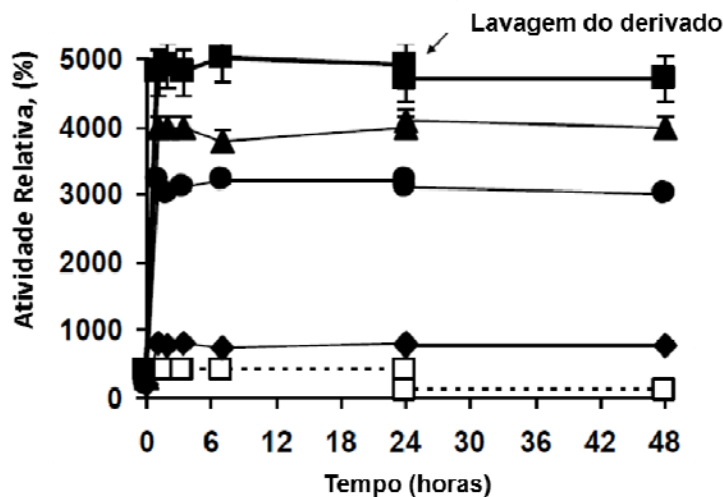
algumas outras alterações positivas na estrutura da enzima não possam ser desconsideradas. Os efeitos negativos podiam ser devido a uma distorção da estrutura da enzima ou a inibição da atividade enzimática.

Assim, no próximo conjunto de experimentos, tentou-se estabilizar as diferentes estruturas das enzimas promovidas pelos detergentes, através de revestimento da enzima com polímeros iônicos, uma vez que estas enzimas modificadas podem apresentar diferentes atividades.

5.4.2 Efeito da incubação da enzima imobilizada na presença de polímeros e detergentes.

A preparação CNBr-Lecitase foi incubada em diferentes concentrações de detergentes seguido pela adição de DS ou PEI para estabilizar a enzima modificada. A Figura 9.2 abaixo nos mostra a incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.

Figura 5.2 - Incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na ausência de polímero, a adição de surfactante aumenta a atividade da enzima cerca de 2 vezes, e a atividade manteve-se praticamente inalterada após 24h de incubação, a concentração máxima utilizada de SDS foi 0,1%. Depois da lavagem da enzima, numa solução tampão, a atividade inicial foi recuperada, perdendo a "hiperativação" causada pela presença de detergente.

Quando PEI é adicionado à suspensão de enzima, depois de vários minutos de incubação em SDS, a atividade aumentou fortemente, e este aumento na atividade é mais elevado que quando, aumentou-se a concentração de SDS, após 30 minutos, a atividade permaneceu inalterada durante 24 horas. Enquanto o revestimento da enzima imobilizada com PEI, na ausência de detergente induziu um aumento de 3 vezes na atividade, de acordo com o trabalho de Santos *et al.* (2014), a presença de 0,1% de SDS antes da adição de PEI melhorou a atividade enzimática em aproximadamente 45-50 vezes.

Depois de lavar com água, as preparações enzimáticas tratadas com os polímeros, a atividade da enzima imobilizada revestida com PEI, na presença de SDS, mantiveram similarmente níveis de hiperativação, mesmo após um mês de incubação a 25°C e um pH de 7. Já o revestimento de CNBr-Lecitase com DS levou a um decréscimo de aproximadamente 50% da atividade inicial na presença ou ausência de qualquer concentração de SDS, mesmo depois de lavar os derivados para eliminar o detergente (Tabela 9.2).

Tabela 5.2 - Atividade recuperada dos derivados de CNBr- Lecitase incubados em polímeros e /ou detergentes. O revestimento da enzima é descrito na seção de métodos. Atividade foi determinada utilizando pNPB como o substrato. O polímero foi adicionado à suspensão depois de incubação com o detergente. A atividade é dada como atividade relativa (100 corresponde a enzima não modificada) após 24 h de incubação no detergente e/ou polímero, lavagem com água e incubação a 25°C em tampão durante mais 24 h.

Detergente	Concentração (%) (v/v)	Polímero	Atividade relativa
Ausente	-	Ausente	100±5
Ausente	-	PEI	300±10
Ausente	-	DS	50±2
SDS	0,1	Ausente	100±5
SDS	0,002	PEI	800±30
SDS	0,01	PEI	3,000±100
SDS	0,05	PEI	4,000±150
SDS	0,1	PEI	5,000±150
SDS	0,002	DS	50±3
SDS	0,01	DS	45±2
SDS	0,05	DS	55±2
SDS	0,1	DS	50±2
CTAB	0,01	Ausente	70±5
CTAB	0,01	PEI	10±0.2
CTAB	0,01	DS	150±5
Triton X-100	0,01	Ausente	85±5
Triton X-100	0,01	PEI	400±20
Triton X-100	0,01	DS	15±3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando 0,01 % (v/v) de CTAB, na ausência de polímeros iônicos, a atividade diminuiu a aproximadamente 70% após 24 h (Tabela 9.2, pag.XX). No entanto, foi observado que quando o PEI é adicionado à solução contendo CTAB, ocorreu uma hiperativação inicial, semelhante à encontrada usando PEI na ausência de surfactantes (resultados não mostrados), mas, após 24h, a atividade foi menor que o CNBr-Lecitase sem polímeros. Após a lavagem para eliminar o detergente, foi verificado uma diminuição da atividade em cerca de 10% (Tabela 9.2, pag. XX). Entretanto, ao usar DS, os resultados eram bem diferentes. Neste caso, o uso de 0,01% de CTAB causou uma hiperativação (150 %) verificada depois de lavar as preparações (Tabela 9.2, pag. XX).

Usando 0,01 % (v/v) de Triton X - 100, na ausência de polímeros, a atividade diminuiu ligeiramente após 24 h (15-20 %) (Tabela 9.2). Na presença de PEI, a atividade do biocatalisador foi 4 vezes mais elevada, um pouco maior do que quando foi utilizado PEI na ausência de surfactante (Tabela 9.2). Ao utilizar DS depois de incubar com Triton X - 100, foi observado uma atividade final cerca de 15% menor do que quando usando DS na ausência de detergente (Tabela 9.2).

O SDS tem efeitos positivos principalmente com PEI, enquanto que o CTAB (que tem um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima) tem certo efeito positivo sobre a atividade da enzima utilizando DS, o que é surpreendente porque DS teve um efeito negativo sobre a atividade enzimática e seria de esperar que ele favorecesse a acumulação de CTAB no ambiente da enzima. Aparentemente, diversos fatores estão contribuindo ao mesmo tempo para o sistema e, portanto, uma explicação simples destes resultados não pode ser determinada. No entanto, em alguns casos, uma hiperativação muito importante foi identificado.

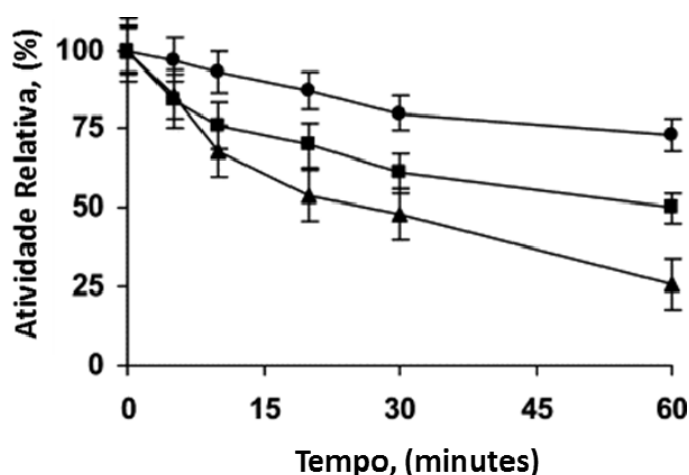
Assim, utilizando-se p-NPB como um substrato, o efeito mais positivo sobre a atividade da enzima ocorreu utilizando SDS seguido por revestimento de PEI, a produção de uma preparação de CNBr-Lecitase, aproximadamente 50 vezes mais ativa do que a preparação não modificado.

5.3.3 Estudo da acessibilidade dos resíduos catalíticos de Ser para o meio

Para verificar se este biocatalisador modificado apresenta uma serina catalítica que é mais acessível para o meio do que a preparação nativa por CNBr, ambos derivados Lecitase foram incubadas com D-pNPP para analisar a taxa de inibição irreversível

(HELISTÖ, *et al.*, 1998). A Figura 9.3 (pag. XX) mostra que CNBr Lecitase revestido com PEI é inibida mesmo mais lento do que o não modificado CNBr Lecitase. No entanto, se o revestimento de PEI foi realizada na presença de SDS, a taxa de inativação torna-se mais rápida do que a da preparação de CNBr-Lecitase.

Figura 5.3 - Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição estão descritos na seção de materiais e métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir atividade. Quadrados: CNBr-Lecitase; triângulos: CNBr-Lecitase - SDS revestido com PEI; círculos: CNBr Lecitase-PEI.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, a preparação CNBr-Lecitase incubada em SDS e revestida com PEI permitiu o *Ser* catalítica ser mais expostos ao meio de reação do que a contrapartida não modificada, o que sugere que o biocatalisador Lecitase é estabilizado na forma aberta, enquanto a preparação sem polímero de Lecitase esta num equilíbrio entre as formas abertas e fechadas.

No entanto, a elevada hiperativação observada com p-NPB como substrato (cerca de 50 vezes) não se encaixa com o aumento da taxa de inibição (3-4 vezes em comparação com a enzima sozinha revestida com PEI), o que sugere que existem mais alguns causa para esta hiperativação do que apenas a estabilização de uma conformação aberta da enzima. Na verdade, tem sido relatado que alguns detergentes hiperativa Lecitase imobilizada em octil-agarose, que já está na conformação aberta da enzima (GARCIA-GALAN, *et al.*, 2014).

Segundo Santos, *et al.* (2014) o revestimento com PEI, na ausência de detergente

aumentou a atividade da enzima em proporção de 3 vezes, enquanto que reduziu a taxa de inibição irreversível por D-pNPP, sugerindo que a PEI pode promover algumas mudanças conformacionais que fazem a enzima mais ativa, mas não de uma forma que está relacionada com a estabilização da conformação aberta de Lecitase. Aparentemente, na presença de SDS, estas alterações conformacionais produzidas pelo polímero são ainda mais positivas.

5.4 Conclusões

A atividade da preparação CNBr-Lecitase pode ser aumentada pela incubação com baixas concentrações de detergentes, a atividade final é resultante de vários fatores: a estabilização da forma aberta da lipase, a inibição de enzimas e da distorção. No entanto, para além das complicações o resultado final proposto em utilização industrial seria que detergentes têm alguns efeitos deletérios sobre as propriedades Lecitase, que afetam principalmente a sua estabilidade. A incubação desta preparação imobilizada em soluções de detergente e outro revestimento da enzima com polímeros iônicos permitiu obter preparações hiperativada.

No entanto, foi necessário selecionar um polímero apropriado e detergente para maximizar os efeitos positivos, e esta seleção deve basear-se em estudos empíricos, devido à complexidade do processo envolvido. Além disso, espera-se que esta estratégia possa ser útil para a obtenção de preparações de lipase hiperativada de outras preparações imobilizadas covalentemente. Neste caso, a incubação em SDS da Lecitase imobilizada seguida por revestimento com PEI melhorou a atividade de 50 vezes, a estabilização da conformação aberta e ativa da lipase, com uma exposição mais elevada da *Ser* catalítica, que pode, pelo menos parcialmente, explicar este aumento na atividade. Outros polímeros, tais como o DS, ou outros detergentes (CTAB e Triton X-100), produziram muito mais reduzidas, e, em alguns casos, mesmo negativos, o efeito sobre a atividade da enzima.

Segundo Santos, *et al.* (2014), a interação do polímero com a proteína pode promover efeitos diferentes, que podem conduzir a uma afinação final das propriedades das enzimas, onde a hidrofilição global da superfície da enzima pode alterar o fechamento/abertura em equilíbrio. Esses polímeros podem gerar alguns empecilhos para os movimentos da tampa, ou pode favorecer a partição de substâncias diferentes. Os efeitos de polímero podem ser diferentes dependendo da sua natureza catiônica ou aniônica, por causa da área envolvida nas interações polímero/enzima.

Capítulo 6

*Versatilidade do suporte ativado com divinilsulfona para o
melhoramento das propriedades de CALB durante sua imobilização*

6.1. Resumo

Lecitase Ultra foi imobilizada covalentemente em brometo de cianogênio agarose (CNBr) reticulada 4%, mantendo 70% da atividade inicial. A atividade da enzima imobilizada foi melhorada na presença de Triton X-100, dodecil-sulfato de sódio (SDS), e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (por exemplo, em até 800% quando CTAB foi utilizado). No entanto, CTAB e Triton X-100 apresentaram um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima, mesmo em baixas concentrações, e SDS não pode ser utilizado por um longo tempo na concentração de 1%. Para manter a conformação hiperativada da enzima na ausência de detergente, polímeros iônicos foram adicionados durante a incubação da enzima imobilizada na presença de detergentes. O revestimento da enzima imobilizada com polietilenimina (PEI) em tampão aquoso produziu um aumento de 3 vezes na atividade da enzima. No entanto, na presença de SDS a 0,1% (v/v), este revestimento produziu um aumento de 50 vezes na atividade da enzima. Usando PEI e 0,01% (v/v) de CTAB, a atividade Lecitase diminuiu para 10%. Usando inibidores irreversíveis, pode ser demonstrado que a preparação PEI/SDS-CNBr-Lecitase permitiu que seu sítio catalítico *Ser* (serina) ser mais acessível ao meio de reação que a preparação CNBr-Lecitase não modificada.

Palavras-chave: Lecitase. Hiperativação de enzima. Detergente. PEI. Modificação física em fase sólida. *Bioimprinting*.

6.2 Introdução

A melhoria da atividade da enzima é um dos alvos mais interessantes na produção de um biocatalisador. Este aumento de atividade é conseguido ao modificar a enzima utilizando diversas ferramentas, tais como mutagênese dirigida local (DUAN *et al.*, 2013), evolução dirigida (STEFFLER *et al.*, 2013; TURNER, 2009) a modificação química (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011), entre outros.

No entanto, deve considerar-se que, na maioria dos casos, as enzimas são utilizadas, em escala industrial, de uma forma imobilizada, para permitir a sua reutilização (se a enzima imobilizada é suficientemente estável). (DICOSIMO *et al.*, 2013; LIESE *et al.*, 2013). Assim, pode ser interessante para o desenvolvimento de estratégias que objetivam melhorar a atividade da enzima durante a preparação do biocatalisador, serem compatível com a estratégia de melhorar diretamente o desempenho da enzima através de ferramentas genéticas (RODRIGUES *et al.*, 2011; HERNANDEZ *et al.*, 2011).

A imobilização é, em muitos casos, associada a um decréscimo na atividade enzimática, por várias razões, por exemplo, a distorção da enzima, os problemas de difusão, problemas estéricos. No entanto, um protocolo de imobilização adequado pode manter, ou mesmo aumentar, a atividade da enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A melhoria da atividade pode ser encontrada em alguns casos, impedindo algumas das razões para a redução da atividade da enzima, tal como a inibição ou a distorção, enquanto em outros casos, através da produção de uma enzima conformação mais ativa. (RODRIGUES *et al.*, 2013)

As lipases têm um mecanismo catalítico chamado ativação interfacial. (VERGER *et al.*, 1997; BERG *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2009). O centro ativo é isolado, a partir do meio de reação, através de uma cadeia de oligopéptidos, chamada "aba" ou "tampa" (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991; TILBEURGH *et al.*, 1993).

A face interna da tampa é hidrofóbica e interage com os domínios hidrofóbicos que rodeiam o centro ativo. Esta tampa pode ser movida para fora expondo este bolso muito hidrofóbico para o meio. Esta conformação é instável em meio aquoso, fazendo com que as moléculas de enzima estejam na conformação "fechada", ou seja, sem atividade a maior parte do tempo. Na presença do seu substrato natural (uma gota de óleo), a bolsa hidrofóbica permite a adsorção da enzima sobre a sua superfície, a estabilização da conformação aberta e ativa da lipase, permitindo que a lipase para atuar na interface da gota de óleo e o sistema aquoso.

As lipases também têm sido hiperativada durante a preparação de biocatalisadores, usando condições nas quais a estrutura da enzima encontra-se aberta e capaz de ser ainda mais estabilizada nesta conformação. Nestes casos, a conformação aberta, tem sido tipicamente produzida utilizando detergentes; essas moléculas anfipáticas estabiliza a conformação aberta das lipases (GUNCHEVA *et al.*, 2007; HELISTÖ *et al.*, 1998), mas também pode atuar como inibidores (GARGOURI *et al.*, 1983), levando à sua inativação (MOGENSEN *et al.*, 2005; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Assim, as lipases têm sido liofilizadas (MINGARRO *et al.*, 1995), onde precipitou reticulado (LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2002), ionicamente adsorvido (FILICE *et al.*, 2011), ou reticulada com glutaraldeído (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006) na presença de detergentes para permitir a congelação da forma aberta, de modo que a conformação ativa e aberta irá persistir após o detergente ser eliminado.

Além disso, o revestimento físico em fase sólida de enzimas com polímeros iônicos é declaradamente um método bastante simples e rápido para a modificação da atividade da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2011). Este revestimento com polímeros iônicos tem sido proposto como um meio para melhorar a estabilidade da enzima, sob certas condições. (BRYJAK *et al.*, 1995). Por exemplo, a presença de solventes orgânicos ou de oxigênio por segregar estes reagentes hidrofóbicos a partir do ambiente da enzima (MATEO *et al.*, 2006; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1999), impedindo assim dissociação da enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2013). Em alguns casos, o revestimento de polímero de lipases foi reportado para melhorar o comportamento catalítico da enzima (por exemplo, a especificidade) (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2012; CABRERA *et al.*, 2010; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2009).

Lecitase Ultra é uma fosfolipase A1 comercial desenvolvida principalmente para os processos de degomagem (DE MARIA *et al.*, 2007), apesar de fosfolipases A1 poderem ter diferentes usos. (HAVN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006; NA *et al.*, 1990; DEVOS *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2006). Esta enzima tem sido obtida a partir da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, para conseguir uma boa estabilidade, e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum*, para obter a atividade da fosfolipase. (DE MARIA *et al.*, 2007)).

Com isso a enzima tem sido encontrada por se comportar como uma lipase padrão, com a capacidade de ser adsorvida nas superfícies hidrofóbicas, por exemplo, suportes hidrófobos (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007) e por apresentar uma ampla especificidade (YANG *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2013; LIU *et al.*,

2012a; LIU *et al.*, 2012b; LIU *et al.*, 2012c; MISHRA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010 e WANG *et al.*, 2011).

Assim, na atividade de pesquisa realizada, tentou-se obter a conformação aberta estabilizada de Lecitase Ultra, imobilizada em brometo de cianogênio agarose por ligação covalente, via modificação física com polímeros iônicos, “através de reticulação iônica” após a ativação por detergentes.

6.3 Materiais e Métodos

6.3.1 Materiais

A Lecitase foi doada pela Novozymes (Espanha), cerca de 16 mg de proteína/ mL, com uma atividade em pNPB de 5,6 U/mg de proteína. Brometo de cianogênio reticulado 4% (CNBr) foi obtido da GE Healthcare (Pollards Wood, UK). A Polietilenoimina (PEI ramificada, Mn de 10.000, Mw 25.000 Da), o dextrano sulfato (DS, médio Mw, 9000-20000 Da), p-nitrofenil butirato (p-NPB), o Triton X-100, o dodecil sulfato de sódio (SDS), o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e éter p-nitrofenilfosfato (D-pNPP) foram advindos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

6.3.2 Determinação da atividade enzimática

Este ensaio foi realizado através da medição do aumento da absorvância a 348nm produzidos pelo p-nitrofenol libertado na hidrólise de 0,4mM de p-nitrofenilbutirato (p - NPB) em fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 25 °C (sob estas condições $\varepsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para iniciar a reação, 50-100µl de solução de lipase ou de suspensão foi adicionada a 2,55mL da solução de substrato. Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de p-NPB por minuto sob as condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, *et al.*, 1976) e albumina de soro bovino foi utilizada como referência.

6.3.3 Imobilização de Lecitase em CNBr agarose

Um volume de 2,8 mL de Lecitase comercial foi diluída em 67,5 ml de fosfato de sódio 5mM contendo 0,05% (m/v) de dodecil sulfato de sódio a pH7, a 4°C. Em seguida, foi adicionado 15 g de CNBr. A atividade do sobrenadante e a suspensão foram seguidas usando pNPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte com etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Finalmente, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada abundante. O rendimento de imobilização foi superior a 90% e atividade expressa de 70%. (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014).

6.3.4 Revestimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos

O protocolo seguido foi previamente otimizado para o revestimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos (SANTOS, *et al.*, 2014). Em que 10g de Lecitase imobilizada foram adicionados a 100 mL de PEI a um pH de 7 ou DS a pH 5 (1 mg/mL). Em alguns casos, o detergente, para a concentração desejada, foi adicionado 2 minutos antes da adição do polímero, mantendo-se esta mistura, sob suave agitação, durante um período máximo de 24 horas. A atividade foi seguida durante incubação, de acordo com o protocolo de atividade descrito acima com p-NPB.

6.3.5 Análise do efeito dos detergentes sobre a estabilidade de CNBr-Lecitase

Para verificar a estabilidade dos derivados de enzimas na presença de detergentes, 1g de enzima imobilizada foi suspenso em 5 mL de fosfato de sódio 10 mM a pH 7, a 25 °C. Periodicamente, foram retiradas amostras, e a atividade foi medida usando pNPB. Uma suspensão de CNBr-Lecitase na ausência de detergente foi utilizado como uma referência. O valor de atividade obtido utilizando a suspensão de referência, e adicionando à mistura de reação a quantidade equivalente de detergente em cada amostra (para distinguir efeitos de ativação / inibição do detergente presente nas suspensões problemáticas) foi tomada como 100% de atividade.

6.3.6 Inativação irreversível de Lecitase imobilizada na presença de D-pNPP

Diferentes preparações imobilizadas-lipase (0,8 g) foram suspensas em 5 mL de solução tampão de fosfato de sódio 100mM a pH7 em 25 °C. Em seguida, a D-pNPP foi adicionado até uma concentração de 1mM. Amostras desta suspensão foram retiradas periodicamente, e suas atividades foram verificadas utilizando como ensaio p-NPB.

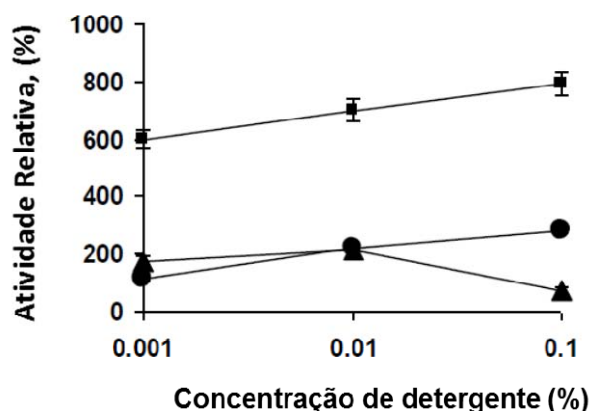
6.4 Resultados

6.4.1 Efeito do detergente nas propriedades da enzima

Três detergentes com características diferentes foram testados: CTAB, um surfactante catiônico; SDS, um agente tensoativo aniônico; e Triton X-100, um surfactante não iônico. A Figura 9.1 (p.XX) mostra os efeitos sobre a atividade enzimática de cada detergente. Na gama de concentrações estudadas, CNBr-Lecitase foi hiperativada na maioria dos casos. A maior hiperativação foi detectada usando CTAB (quase 8 vezes), e o efeito aumentou junto ao aumento da concentração de detergente. SDS teve um efeito positivo em baixas concentrações (aumentar o aumento da atividade por dupla em 0,01%). No entanto, a 0,1% de SDS, a atividade foi menor do que na ausência de SDS. Triton X-100 mostrou um efeito menor sobre a atividade da enzima em concentrações de detergente baixas, mas a 0,1%, a atividade foi quase três vezes maior do que o controle.

Além disso, a preparação enzimática foi incubada na presença destes detergentes para verificar o seu efeito sobre a estabilidade da enzima (Tabela 9.1). Utilizando 0,1% de SDS, a atividade enzimática observada depois de 24 h foi de quase 100%, enquanto que com 0,1 % de Triton X-100, a atividade diminuiu lentamente, e com CTAB, a atividade diminuiu rapidamente. A atividade recuperada após 24 horas foi de 80% utilizando Triton X-100, e 10% usando CTAB. A atividade recuperada foi maior quando foi utilizada uma concentração de 0,01% para ambos detergentes.

Figura 6.1- Efeito dos detergentes na atividade da Lecitase imobilizada. Atividade foi determinada utilizando pNPB como indicado na seção de métodos. Triângulos: SDS, quadrados: CTAB, Círculos: Triton X-100.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora os três detergentes apresentassem efeitos positivos sobre a atividade da enzima, sua presença na solução tinha um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima; o efeito foi mais significativo com o detergente mais hiperativante (CTAB). Usando SDS, foi observado um maior efeito de hiperativação quando utilizando uma concentração máxima de até 0,1% desse detergente, no entanto a concentração máxima que pode ser utilizada por um período de tempo prolongado foi de 0,01%.

Tabela 6.1- Efeito da presença de detergentes na atividade de CNBr-Lecitase. CNBr-Lecitase foi incubado a pH 7 e 25°C em 25mM de fosfato de sódio com concentração indicada de detergente, durante 24 h. Em seguida, as preparações foram lavadas e a atividade do biocatalisador foi medida utilizando pNPB (ver métodos). * 100 é a atividade inicial do biocatalisador.

Detergente	Concentração (%), (v/v)	Atividade recuperada(%)*
Ausente	-	100
Triton X-100	0.1	60±3
Triton X-100	0.01	80±3
SDS 0.1	0.1	100±5
SDS 0.01	0.01	100±4
CTAB	0.1	>10
CTAB	0.01	60±2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os efeitos positivos dos detergentes sobre a atividade da lipase é o mais provável, ao menos parcialmente, devido à estabilização da conformação aberta da enzima, embora

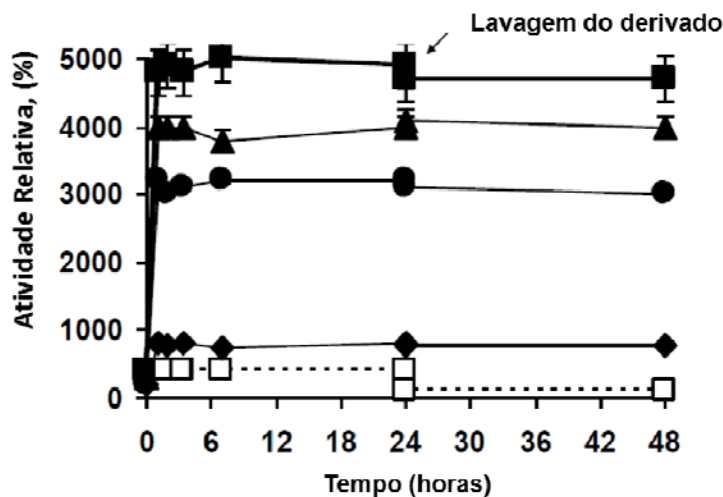
algumas outras alterações positivas na estrutura da enzima não possam ser desconsideradas. Os efeitos negativos podiam ser devido a uma distorção da estrutura da enzima ou a inibição da atividade enzimática.

Assim, no próximo conjunto de experimentos, tentou-se estabilizar as diferentes estruturas das enzimas promovidas pelos detergentes, através de revestimento da enzima com polímeros iônicos, uma vez que estas enzimas modificadas podem apresentar diferentes atividades.

6.4.2 Efeito da incubação da enzima imobilizada na presença de polímeros e detergentes

A preparação CNBr-Lecitase foi incubada em diferentes concentrações de detergentes seguido pela adição de DS ou PEI para estabilizar a enzima modificada. A Figura 9.2 abaixo nos mostra a incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.

Figura 9.2 - Incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na ausência de polímero, a adição de surfactante aumenta a atividade da enzima cerca de 2 vezes, e a atividade manteve-se praticamente inalterada após 24h de incubação, a concentração máxima utilizada de SDS foi 0,1%. Depois da lavagem da enzima, numa solução tampão, a atividade inicial foi recuperada, perdendo a "hiperativação" causada pela presença de detergente.

Quando PEI é adicionado à suspensão de enzima, depois de vários minutos de incubação em SDS, a atividade aumentou fortemente, e este aumento na atividade é mais elevado que quando, aumentou-se a concentração de SDS, após 30 minutos, a atividade permaneceu inalterada durante 24 horas. Enquanto o revestimento da enzima imobilizada com PEI, na ausência de detergente induziu um aumento de 3 vezes na atividade, de acordo com o trabalho de Santos *et al.* (2014), a presença de 0,1% de SDS antes da adição de PEI melhorou a atividade enzimática em aproximadamente 45-50 vezes.

Depois de lavar com água, as preparações enzimáticas tratadas com os polímeros, a atividade da enzima imobilizada revestida com PEI, na presença de SDS, mantiveram similarmente níveis de hiperativação, mesmo após um mês de incubação a 25°C e um pH de 7. Já o revestimento de CNBr-Lecitase com DS levou a um decréscimo de aproximadamente 50% da atividade inicial na presença ou ausência de qualquer concentração de SDS, mesmo depois de lavar os derivados para eliminar o detergente (Tabela 6.2).

Tabela 9.2 - Atividade recuperada dos derivados de CNBr- Lecitase incubados em polímeros e /ou detergentes. O revestimento da enzima é descrito na seção de métodos. Atividade foi determinada utilizando pNPB como o substrato. O polímero foi adicionado à suspensão depois de incubação com o detergente. A atividade é dada como atividade relativa (100 corresponde a enzima não modificada) após 24 h de incubação no detergente e/ou polímero, lavagem com água e incubação a 25°C em tampão durante mais 24 h.

Detergente	Concentração (%) (v/v)	Polímero	Atividade relativa
Ausente	-	Ausente	100±5
Ausente	-	PEI	300±10
Ausente	-	DS	50±2
SDS	0,1	Ausente	100±5
SDS	0,002	PEI	800±30
SDS	0,01	PEI	3,000±100
SDS	0,05	PEI	4,000±150
SDS	0,1	PEI	5,000±150
SDS	0,002	DS	50±3
SDS	0,01	DS	45±2
SDS	0,05	DS	55±2
SDS	0,1	DS	50±2
CTAB	0,01	Ausente	70±5
CTAB	0,01	PEI	10±0.2
CTAB	0,01	DS	150±5
Triton X-100	0,01	Ausente	85±5
Triton X-100	0,01	PEI	400±20
Triton X-100	0,01	DS	15±3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando 0,01 % (v/v) de CTAB, na ausência de polímeros iônicos, a atividade diminuiu a aproximadamente 70% após 24 h (Tabela 9.2, pag.XX). No entanto, foi observado que quando o PEI é adicionado à solução contendo CTAB, ocorreu uma hiperativação inicial, semelhante à encontrada usando PEI na ausência de surfactantes (resultados não mostrados), mas, após 24h, a atividade foi menor que o CNBr-Lecitase sem polímeros. Após a lavagem para eliminar o detergente, foi verificado uma diminuição da atividade em cerca de 10% (Tabela 9.2, pag. XX). Entretanto, ao usar DS, os resultados eram bem diferentes. Neste caso, o uso de 0,01% de CTAB causou uma hiperativação (150 %) verificada depois de lavar as preparações (Tabela 9.2, pag. XX).

Usando 0,01 % (v/v) de Triton X - 100, na ausência de polímeros, a atividade diminuiu ligeiramente após 24 h (15-20 %) (Tabela 9.2). Na presença de PEI, a atividade do biocatalisador foi 4 vezes mais elevada, um pouco maior do que quando foi utilizado PEI na ausência de surfactante (Tabela 9.2). Ao utilizar DS depois de incubar com Triton X - 100, foi observado uma atividade final cerca de 15% menor do que quando usando DS na ausência de detergente (Tabela 9.2).

O SDS tem efeitos positivos principalmente com PEI, enquanto que o CTAB (que tem um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima) tem certo efeito positivo sobre a atividade da enzima utilizando DS, o que é surpreendente porque DS teve um efeito negativo sobre a atividade enzimática e seria de esperar que ele favorecesse a acumulação de CTAB no ambiente da enzima. Aparentemente, diversos fatores estão contribuindo ao mesmo tempo para o sistema e, portanto, uma explicação simples destes resultados não pode ser determinada. No entanto, em alguns casos, uma hiperativação muito importante foi identificado.

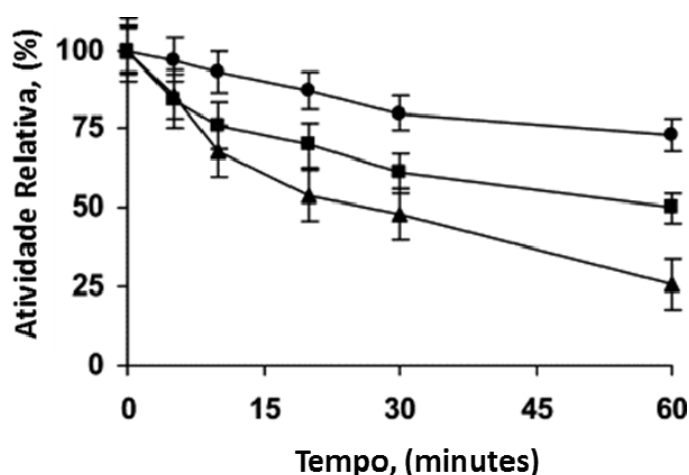
Assim, utilizando-se p-NPB como um substrato, o efeito mais positivo sobre a atividade da enzima ocorreu utilizando SDS seguido por revestimento de PEI, a produção de uma preparação de CNBr-Lecitase, aproximadamente 50 vezes mais ativa do que a preparação não modificado.

6.3.3 Estudo da acessibilidade dos resíduos catalíticos de Ser para o meio

Para verificar se este biocatalisador modificado apresenta uma serina catalítica que é mais acessível para o meio do que a preparação nativa por CNBr, ambos derivados Lecitase foram incubadas com D-pNPP para analisar a taxa de inibição irreversível

(HELISTÖ, *et al.*, 1998). A Figura 9.3 (pag. XX) mostra que CNBr Lecitase revestido com PEI é inibida mesmo mais lento do que o não modificado CNBr Lecitase. No entanto, se o revestimento de PEI foi realizada na presença de SDS, a taxa de inativação torna-se mais rápida do que a da preparação de CNBr-Lecitase.

Figura 9.3 - Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição estão descritos na seção de materiais e métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir atividade. Quadrados: CNBr-Lecitase; triângulos: CNBr-Lecitase - SDS revestido com PEI; círculos: CNBr Lecitase-PEI.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, a preparação CNBr-Lecitase incubada em SDS e revestida com PEI permitiu o *Ser* catalítica ser mais expostos ao meio de reação do que a contrapartida não modificada, o que sugere que o biocatalisador Lecitase é estabilizado na forma aberta, enquanto a preparação sem polímero de Lecitase esta num equilíbrio entre as formas abertas e fechadas.

No entanto, a elevada hiperativação observada com p-NPB como substrato (cerca de 50 vezes) não se encaixa com o aumento da taxa de inibição (3-4 vezes em comparação com a enzima sozinha revestida com PEI), o que sugere que existem mais alguns causa para esta hiperativação do que apenas a estabilização de uma conformação aberta da enzima. Na verdade, tem sido relatado que alguns detergentes hiperativa Lecitase imobilizada em octil-agarose, que já está na conformação aberta da enzima (GARCIA-GALAN, *et al.*, 2014).

Segundo Santos, *et al.* (2014) o revestimento com PEI, na ausência de detergente

aumentou a atividade da enzima em proporção de 3 vezes, enquanto que reduziu a taxa de inibição irreversível por D-pNPP, sugerindo que a PEI pode promover algumas mudanças conformacionais que fazem a enzima mais ativa, mas não de uma forma que está relacionada com a estabilização da conformação aberta de Lecitase. Aparentemente, na presença de SDS, estas alterações conformacionais produzidas pelo polímero são ainda mais positivas.

6.4 Conclusões

A atividade da preparação CNBr-Lecitase pode ser aumentada pela incubação com baixas concentrações de detergentes, a atividade final é resultante de vários fatores: a estabilização da forma aberta da lipase, a inibição de enzimas e da distorção. No entanto, para além das complicações o resultado final proposto em utilização industrial seria que detergentes têm alguns efeitos deletérios sobre as propriedades Lecitase, que afetam principalmente a sua estabilidade. A incubação desta preparação imobilizada em soluções de detergente e outro revestimento da enzima com polímeros iônicos permitiu obter preparações hiperativada.

No entanto, foi necessário selecionar um polímero apropriado e detergente para maximizar os efeitos positivos, e esta seleção deve basear-se em estudos empíricos, devido à complexidade do processo envolvido. Além disso, espera-se que esta estratégia possa ser útil para a obtenção de preparações de lipase hiperativada de outras preparações imobilizadas covalentemente. Neste caso, a incubação em SDS da Lecitase imobilizada seguida por revestimento com PEI melhorou a atividade de 50 vezes, a estabilização da conformação aberta e ativa da lipase, com uma exposição mais elevada da *Ser* catalítica, que pode, pelo menos parcialmente, explicar este aumento na atividade. Outros polímeros, tais como o DS, ou outros detergentes (CTAB e Triton X-100), produziram muito mais reduzidas, e, em alguns casos, mesmo negativos, o efeito sobre a atividade da enzima.

Segundo Santos, *et al.* (2014), a interação do polímero com a proteína pode promover efeitos diferentes, que podem conduzir a uma afinação final das propriedades das enzimas, onde a hidrofilição global da superfície da enzima pode alterar o fechamento/abertura em equilíbrio. Esses polímeros podem gerar alguns empecilhos para os movimentos da tampa, ou pode favorecer a partição de substâncias diferentes. Os efeitos de polímero podem ser diferentes dependendo da sua natureza catiônica ou aniônica, por causa da área envolvida nas interações polímero/enzima.

Capítulo 7

Modulação das propriedades de lipase pela melhoria das características físicas do suporte: efeito do agente bloqueador no suporte ativado com DVS

7.1. Resumo

Lecitase Ultra foi imobilizada covalentemente em brometo de cianogênio agarose (CNBr) reticulada 4%, mantendo 70% da atividade inicial. A atividade da enzima imobilizada foi melhorada na presença de Triton X-100, dodecil-sulfato de sódio (SDS), e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (por exemplo, em até 800% quando CTAB foi utilizado). No entanto, CTAB e Triton X-100 apresentaram um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima, mesmo em baixas concentrações, e SDS não pode ser utilizado por um longo tempo na concentração de 1%. Para manter a conformação hiperativada da enzima na ausência de detergente, polímeros iônicos foram adicionados durante a incubação da enzima imobilizada na presença de detergentes. O revestimento da enzima imobilizada com polietilenimina (PEI) em tampão aquoso produziu um aumento de 3 vezes na atividade da enzima. No entanto, na presença de SDS a 0,1% (v/v), este revestimento produziu um aumento de 50 vezes na atividade da enzima. Usando PEI e 0,01% (v/v) de CTAB, a atividade Lecitase diminuiu para 10%. Usando inibidores irreversíveis, pode ser demonstrado que a preparação PEI/SDS-CNBr-Lecitase permitiu que seu sítio catalítico *Ser* (serina) ser mais acessível ao meio de reação que a preparação CNBr-Lecitase não modificada.

Palavras-chave: Lecitase. Hiperativação de enzima. Detergente. PEI. Modificação física em fase sólida. *Bioimprinting*.

7.2 Introdução

A melhoria da atividade da enzima é um dos alvos mais interessantes na produção de um biocatalisador. Este aumento de atividade é conseguido ao modificar a enzima utilizando diversas ferramentas, tais como mutagênese dirigida local (DUAN *et al.*, 2013), evolução dirigida (STEFFLER *et al.*, 2013; TURNER, 2009) a modificação química (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011), entre outros.

No entanto, deve considerar-se que, na maioria dos casos, as enzimas são utilizadas, em escala industrial, de uma forma imobilizada, para permitir a sua reutilização (se a enzima imobilizada é suficientemente estável). (DICOSIMO *et al.*, 2013; LIESE *et al.*, 2013). Assim, pode ser interessante para o desenvolvimento de estratégias que objetivam melhorar a atividade da enzima durante a preparação do biocatalisador, serem compatível com a estratégia de melhorar diretamente o desempenho da enzima através de ferramentas genéticas (RODRIGUES *et al.*, 2011; HERNANDEZ *et al.*, 2011).

A imobilização é, em muitos casos, associada a um decréscimo na atividade enzimática, por várias razões, por exemplo, a distorção da enzima, os problemas de difusão, problemas estéricos. No entanto, um protocolo de imobilização adequado pode manter, ou mesmo aumentar, a atividade da enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A melhoria da atividade pode ser encontrada em alguns casos, impedindo algumas das razões para a redução da atividade da enzima, tal como a inibição ou a distorção, enquanto em outros casos, através da produção de uma enzima conformação mais ativa. (RODRIGUES *et al.*, 2013)

As lipases têm um mecanismo catalítico chamado ativação interfacial. (VERGER *et al.*, 1997; BERG *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2009). O centro ativo é isolado, a partir do meio de reação, através de uma cadeia de oligopéptidos, chamada "aba" ou "tampa" (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991; TILBEURGH *et al.*, 1993).

A face interna da tampa é hidrofóbica e interage com os domínios hidrofóbicos que rodeiam o centro ativo. Esta tampa pode ser movida para fora expondo este bolso muito hidrofóbico para o meio. Esta conformação é instável em meio aquoso, fazendo com que as moléculas de enzima estejam na conformação "fechada", ou seja, sem atividade a maior parte do tempo. Na presença do seu substrato natural (uma gota de óleo), a bolsa hidrofóbica permite a adsorção da enzima sobre a sua superfície, a estabilização da conformação aberta e ativa da lipase, permitindo que a lipase para atuar na interface da gota de óleo e o sistema aquoso.

As lipases também têm sido hiperativada durante a preparação de biocatalisadores, usando condições nas quais a estrutura da enzima encontra-se aberta e capaz de ser ainda mais estabilizada nesta conformação. Nestes casos, a conformação aberta, tem sido tipicamente produzida utilizando detergentes; essas moléculas anfipáticas estabiliza a conformação aberta das lipases (GUNCHEVA *et al.*, 2007; HELISTÖ *et al.*, 1998), mas também pode atuar como inibidores (GARGOURI *et al.*, 1983), levando à sua inativação (MOGENSEN *et al.*, 2005; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Assim, as lipases têm sido liofilizadas (MINGARRO *et al.*, 1995), onde precipitou reticulado (LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2002), ionicamente adsorvido (FILICE *et al.*, 2011), ou reticulada com glutaraldeído (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006) na presença de detergentes para permitir a congelação da forma aberta, de modo que a conformação ativa e aberta irá persistir após o detergente ser eliminado.

Além disso, o revestimento físico em fase sólida de enzimas com polímeros iônicos é declaradamente um método bastante simples e rápido para a modificação da atividade da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2011). Este revestimento com polímeros iônicos tem sido proposto como um meio para melhorar a estabilidade da enzima, sob certas condições. (BRYJAK *et al.*, 1995). Por exemplo, a presença de solventes orgânicos ou de oxigênio por segregar estes reagentes hidrofóbicos a partir do ambiente da enzima (MATEO *et al.*, 2006; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1999), impedindo assim dissociação da enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2013). Em alguns casos, o revestimento de polímero de lipases foi reportado para melhorar o comportamento catalítico da enzima (por exemplo, a especificidade) (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2012; CABRERA *et al.*, 2010; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2009).

Lecitase Ultra é uma fosfolipase A1 comercial desenvolvida principalmente para os processos de degomagem (DE MARIA *et al.*, 2007), apesar de fosfolipases A1 poderem ter diferentes usos. (HAVN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006; NA *et al.*, 1990; DEVOS *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2006). Esta enzima tem sido obtida a partir da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, para conseguir uma boa estabilidade, e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum*, para obter a atividade da fosfolipase. (DE MARIA *et al.*, 2007)).

Com isso a enzima tem sido encontrada por se comportar como uma lipase padrão, com a capacidade de ser adsorvida nas superfícies hidrofóbicas, por exemplo, suportes hidrófobos (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007) e por apresentar uma ampla especificidade (YANG *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2013; LIU *et al.*,

2012a; LIU *et al.*, 2012b; LIU *et al.*, 2012c; MISHRA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010 e WANG *et al.*, 2011).

Assim, na atividade de pesquisa realizada, tentou-se obter a conformação aberta estabilizada de Lecitase Ultra, imobilizada em brometo de cianogênio agarose por ligação covalente, via modificação física com polímeros iônicos, “através de reticulação iônica” após a ativação por detergentes.

7.3 Materiais e Métodos

7.3.1 Materiais

A Lecitase foi doada pela Novozymes (Espanha), cerca de 16 mg de proteína/ mL, com uma atividade em pNPB de 5,6 U/mg de proteína. Brometo de cianogênio reticulado 4% (CNBr) foi obtido da GE Healthcare (Pollards Wood, UK). A Polietilenoimina (PEI ramificada, Mn de 10.000, Mw 25.000 Da), o dextrano sulfato (DS, médio Mw, 9000-20000 Da), p-nitrofenil butirato (p-NPB), o Triton X-100, o dodecil sulfato de sódio (SDS), o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e éter p-nitrofenilfosfato (D-pNPP) foram advindos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

7.3.2 Determinação da atividade enzimática

Este ensaio foi realizado através da medição do aumento da absorvância a 348nm produzidos pelo p-nitrofenol libertado na hidrólise de 0,4mM de p-nitrofenilbutirato (p - NPB) em fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 25 °C (sob estas condições $\varepsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para iniciar a reação, 50-100µl de solução de lipase ou de suspensão foi adicionada a 2,55mL da solução de substrato. Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de p-NPB por minuto sob as condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, *et al.*, 1976) e albumina de soro bovino foi utilizada como referência.

7.3.3 Imobilização de Lecitase em CNBr agarose

Um volume de 2,8 mL de Lecitase comercial foi diluída em 67,5 mL de fosfato de sódio 5mM contendo 0,05% (m/v) de dodecil sulfato de sódio a pH7, a 4°C. Em seguida, foi adicionado 15 g de CNBr. A atividade do sobrenadante e a suspensão foram seguidas usando pNPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte com etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Finalmente, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada abundante. O rendimento de imobilização foi superior a 90% e atividade expressa de 70%. (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014).

7.3.4 Revestimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos

O protocolo seguido foi previamente otimizado para o revestimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos (SANTOS, *et al.*, 2014). Em que 10g de Lecitase imobilizada foram adicionados a 100 mL de PEI a um pH de 7 ou DS a pH 5 (1 mg/mL). Em alguns casos, o detergente, para a concentração desejada, foi adicionado 2 minutos antes da adição do polímero, mantendo-se esta mistura, sob suave agitação, durante um período máximo de 24 horas. A atividade foi seguida durante incubação, de acordo com o protocolo de atividade descrito acima com p-NPB.

7.3.5 Análise do efeito dos detergentes sobre a estabilidade de CNBr-Lecitase

Para verificar a estabilidade dos derivados de enzimas na presença de detergentes, 1g de enzima imobilizada foi suspenso em 5 mL de fosfato de sódio 10 mM a pH 7, a 25 °C. Periodicamente, foram retiradas amostras, e a atividade foi medida usando pNPB. Uma suspensão de CNBr-Lecitase na ausência de detergente foi utilizado como uma referência. O valor de atividade obtido utilizando a suspensão de referência, e adicionando à mistura de reação a quantidade equivalente de detergente em cada amostra (para distinguir efeitos de ativação / inibição do detergente presente nas suspensões problemáticas) foi tomada como 100% de atividade.

7.3.6 Inativação irreversível de Lecitase imobilizada na presença de D-pNPP

Diferentes preparações imobilizadas-lipase (0,8 g) foram suspensas em 5 mL de solução tampão de fosfato de sódio 100mM a pH7 em 25 °C. Em seguida, a D-pNPP foi adicionado até uma concentração de 1mM. Amostras desta suspensão foram retiradas periodicamente, e suas atividades foram verificadas utilizando como ensaio p-NPB.

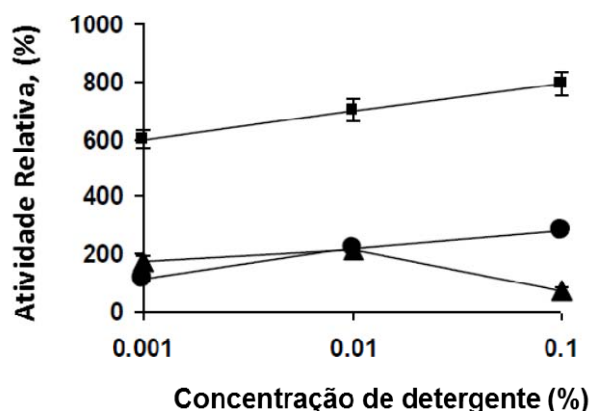
7.4 Resultados

7.4.1 Efeito do detergente nas propriedades da enzima

Três detergentes com características diferentes foram testados: CTAB, um surfactante catiônico; SDS, um agente tensoativo aniônico; e Triton X-100, um surfactante não iônico. A Figura 9.1 (p.XX) mostra os efeitos sobre a atividade enzimática de cada detergente. Na gama de concentrações estudadas, CNBr-Lecitase foi hiperativada na maioria dos casos. A maior hiperativação foi detectada usando CTAB (quase 8 vezes), e o efeito aumentou junto ao aumento da concentração de detergente. SDS teve um efeito positivo em baixas concentrações (aumentar o aumento da atividade por dupla em 0,01%). No entanto, a 0,1% de SDS, a atividade foi menor do que na ausência de SDS. Triton X-100 mostrou um efeito menor sobre a atividade da enzima em concentrações de detergente baixas, mas a 0,1%, a atividade foi quase três vezes maior do que o controle.

Além disso, a preparação enzimática foi incubada na presença destes detergentes para verificar o seu efeito sobre a estabilidade da enzima (Tabela 9.1). Utilizando 0,1% de SDS, a atividade enzimática observada depois de 24 h foi de quase 100%, enquanto que com 0,1 % de Triton X-100, a atividade diminuiu lentamente, e com CTAB, a atividade diminuiu rapidamente. A atividade recuperada após 24 horas foi de 80% utilizando Triton X-100, e 10% usando CTAB. A atividade recuperada foi maior quando foi utilizada uma concentração de 0,01% para ambos detergentes.

Figura 7.1- Efeito dos detergentes na atividade da Lecitase imobilizada. Atividade foi determinada utilizando pNPB como indicado na seção de métodos. Triângulos: SDS, quadrados: CTAB, Círculos: Triton X-100.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora os três detergentes apresentassem efeitos positivos sobre a atividade da enzima, sua presença na solução tinha um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima; o efeito foi mais significativo com o detergente mais hiperativante (CTAB). Usando SDS, foi observado um maior efeito de hiperativação quando utilizando uma concentração máxima de até 0,1% desse detergente, no entanto a concentração máxima que pode ser utilizada por um período de tempo prolongado foi de 0,01%.

Tabela 7.1- Efeito da presença de detergentes na atividade de CNBr-Lecitase. CNBr-Lecitase foi incubado a pH 7 e 25°C em 25mM de fosfato de sódio com concentração indicada de detergente, durante 24 h. Em seguida, as preparações foram lavadas e a atividade do biocatalisador foi medida utilizando pNPB (ver métodos). * 100 é a atividade inicial do biocatalisador.

Detergente	Concentração (%), (v/v)	Atividade recuperada(%)*
Ausente	-	100
Triton X-100	0.1	60±3
Triton X-100	0.01	80±3
SDS 0.1	0.1	100±5
SDS 0.01	0.01	100±4
CTAB	0.1	>10
CTAB	0.01	60±2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os efeitos positivos dos detergentes sobre a atividade da lipase é o mais provável, ao menos parcialmente, devido à estabilização da conformação aberta da enzima, embora

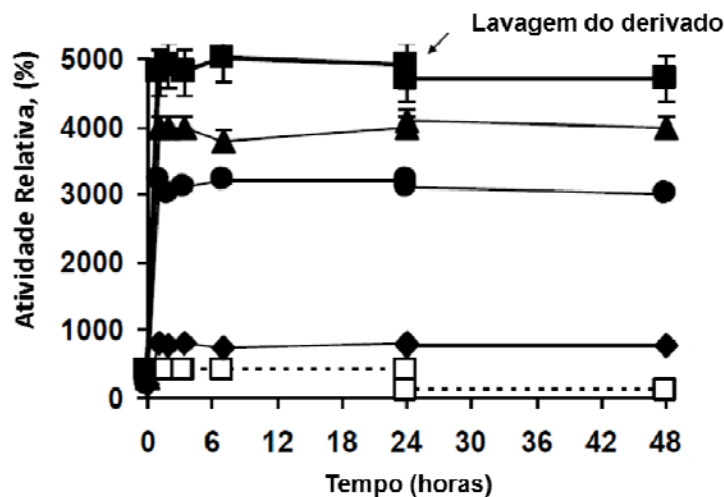
algumas outras alterações positivas na estrutura da enzima não possam ser desconsideradas. Os efeitos negativos podiam ser devido a uma distorção da estrutura da enzima ou a inibição da atividade enzimática.

Assim, no próximo conjunto de experimentos, tentou-se estabilizar as diferentes estruturas das enzimas promovidas pelos detergentes, através de revestimento da enzima com polímeros iônicos, uma vez que estas enzimas modificadas podem apresentar diferentes atividades.

7.4.2 Efeito da incubação da enzima imobilizada na presença de polímeros e detergentes

A preparação CNBr-Lecitase foi incubada em diferentes concentrações de detergentes seguido pela adição de DS ou PEI para estabilizar a enzima modificada. A Figura 9.2 abaixo nos mostra a incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.

Figura 7.2 - Incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na ausência de polímero, a adição de surfactante aumenta a atividade da enzima cerca de 2 vezes, e a atividade manteve-se praticamente inalterada após 24h de incubação, a concentração máxima utilizada de SDS foi 0,1%. Depois da lavagem da enzima, numa solução tampão, a atividade inicial foi recuperada, perdendo a "hiperativação" causada pela presença de detergente.

Quando PEI é adicionado à suspensão de enzima, depois de vários minutos de incubação em SDS, a atividade aumentou fortemente, e este aumento na atividade é mais elevado que quando, aumentou-se a concentração de SDS, após 30 minutos, a atividade permaneceu inalterada durante 24 horas. Enquanto o revestimento da enzima imobilizada com PEI, na ausência de detergente induziu um aumento de 3 vezes na atividade, de acordo com o trabalho de Santos *et al.* (2014), a presença de 0,1% de SDS antes da adição de PEI melhorou a atividade enzimática em aproximadamente 45-50 vezes.

Depois de lavar com água, as preparações enzimáticas tratadas com os polímeros, a atividade da enzima imobilizada revestida com PEI, na presença de SDS, mantiveram similarmente níveis de hiperativação, mesmo após um mês de incubação a 25°C e um pH de 7. Já o revestimento de CNBr-Lecitase com DS levou a um decréscimo de aproximadamente 50% da atividade inicial na presença ou ausência de qualquer concentração de SDS, mesmo depois de lavar os derivados para eliminar o detergente (Tabela 7.2).

Tabela 7.2 - Atividade recuperada dos derivados de CNBr- Lecitase incubados em polímeros e /ou detergentes. O revestimento da enzima é descrito na seção de métodos. Atividade foi determinada utilizando pNPB como o substrato. O polímero foi adicionado à suspensão depois de incubação com o detergente. A atividade é dada como atividade relativa (100 corresponde a enzima não modificada) após 24 h de incubação no detergente e/ou polímero, lavagem com água e incubação a 25°C em tampão durante mais 24 h.

Detergente	Concentração (%) (v/v)	Polímero	Atividade relativa
Ausente	-	Ausente	100±5
Ausente	-	PEI	300±10
Ausente	-	DS	50±2
SDS	0,1	Ausente	100±5
SDS	0,002	PEI	800±30
SDS	0,01	PEI	3,000±100
SDS	0,05	PEI	4,000±150
SDS	0,1	PEI	5,000±150
SDS	0,002	DS	50±3
SDS	0,01	DS	45±2
SDS	0,05	DS	55±2
SDS	0,1	DS	50±2
CTAB	0,01	Ausente	70±5
CTAB	0,01	PEI	10±0.2
CTAB	0,01	DS	150±5
Triton X-100	0,01	Ausente	85±5
Triton X-100	0,01	PEI	400±20
Triton X-100	0,01	DS	15±3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando 0,01 % (v/v) de CTAB, na ausência de polímeros iônicos, a atividade diminuiu a aproximadamente 70% após 24 h (Tabela 9.2, pag.XX). No entanto, foi observado que quando o PEI é adicionado à solução contendo CTAB, ocorreu uma hiperativação inicial, semelhante à encontrada usando PEI na ausência de surfactantes (resultados não mostrados), mas, após 24h, a atividade foi menor que o CNBr-Lecitase sem polímeros. Após a lavagem para eliminar o detergente, foi verificado uma diminuição da atividade em cerca de 10% (Tabela 9.2, pag. XX). Entretanto, ao usar DS, os resultados eram bem diferentes. Neste caso, o uso de 0,01% de CTAB causou uma hiperativação (150 %) verificada depois de lavar as preparações (Tabela 9.2, pag. XX).

Usando 0,01 % (v/v) de Triton X - 100, na ausência de polímeros, a atividade diminuiu ligeiramente após 24 h (15-20 %) (Tabela 9.2). Na presença de PEI, a atividade do biocatalisador foi 4 vezes mais elevada, um pouco maior do que quando foi utilizado PEI na ausência de surfactante (Tabela 9.2). Ao utilizar DS depois de incubar com Triton X - 100, foi observado uma atividade final cerca de 15% menor do que quando usando DS na ausência de detergente (Tabela 7.2).

O SDS tem efeitos positivos principalmente com PEI, enquanto que o CTAB (que tem um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima) tem certo efeito positivo sobre a atividade da enzima utilizando DS, o que é surpreendente porque DS teve um efeito negativo sobre a atividade enzimática e seria de esperar que ele favorecesse a acumulação de CTAB no ambiente da enzima. Aparentemente, diversos fatores estão contribuindo ao mesmo tempo para o sistema e, portanto, uma explicação simples destes resultados não pode ser determinada. No entanto, em alguns casos, uma hiperativação muito importante foi identificado.

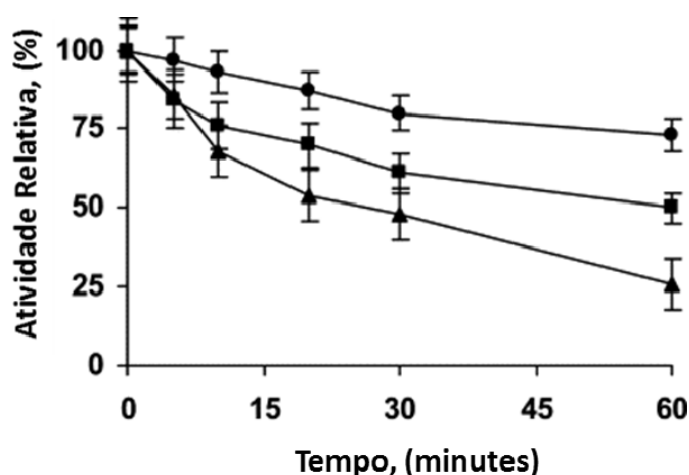
Assim, utilizando-se p-NPB como um substrato, o efeito mais positivo sobre a atividade da enzima ocorreu utilizando SDS seguido por revestimento de PEI, a produção de uma preparação de CNBr-Lecitase, aproximadamente 50 vezes mais ativa do que a preparação não modificado.

7.4.3 Estudo da acessibilidade dos resíduos catalíticos de Ser para o meio

Para verificar se este biocatalisador modificado apresenta uma serina catalítica que é mais acessível para o meio do que a preparação nativa por CNBr, ambos derivados Lecitase foram incubadas com D-pNPP para analisar a taxa de inibição irreversível

(HELISTÖ, *et al.*, 1998). A Figura 9.3 (pag. XX) mostra que CNBr Lecitase revestido com PEI é inibida mesmo mais lento do que o não modificado CNBr Lecitase. No entanto, se o revestimento de PEI foi realizada na presença de SDS, a taxa de inativação torna-se mais rápida do que a da preparação de CNBr-Lecitase.

Figura 7.3 - Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição estão descritos na seção de materiais e métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir atividade. Quadrados: CNBr-Lecitase; triângulos: CNBr-Lecitase - SDS revestido com PEI; círculos: CNBr Lecitase-PEI.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, a preparação CNBr-Lecitase incubada em SDS e revestida com PEI permitiu o *Ser* catalítica ser mais expostos ao meio de reação do que a contrapartida não modificada, o que sugere que o biocatalisador Lecitase é estabilizado na forma aberta, enquanto a preparação sem polímero de Lecitase esta num equilíbrio entre as formas abertas e fechadas.

No entanto, a elevada hiperativação observada com p-NPB como substrato (cerca de 50 vezes) não se encaixa com o aumento da taxa de inibição (3-4 vezes em comparação com a enzima sozinha revestida com PEI), o que sugere que existem mais alguns causa para esta hiperativação do que apenas a estabilização de uma conformação aberta da enzima. Na verdade, tem sido relatado que alguns detergentes hiperativa Lecitase imobilizada em octil-agarose, que já está na conformação aberta da enzima (GARCIA-GALAN, *et al.*, 2014).

Segundo Santos, *et al.* (2014) o revestimento com PEI, na ausência de detergente

aumentou a atividade da enzima em proporção de 3 vezes, enquanto que reduziu a taxa de inibição irreversível por D-pNPP, sugerindo que a PEI pode promover algumas mudanças conformacionais que fazem a enzima mais ativa, mas não de uma forma que está relacionada com a estabilização da conformação aberta de Lecitase. Aparentemente, na presença de SDS, estas alterações conformacionais produzidas pelo polímero são ainda mais positivas.

7.4 Conclusões

A atividade da preparação CNBr-Lecitase pode ser aumentada pela incubação com baixas concentrações de detergentes, a atividade final é resultante de vários fatores: a estabilização da forma aberta da lipase, a inibição de enzimas e da distorção. No entanto, para além das complicações o resultado final proposto em utilização industrial seria que detergentes têm alguns efeitos deletérios sobre as propriedades Lecitase, que afetam principalmente a sua estabilidade. A incubação desta preparação imobilizada em soluções de detergente e outro revestimento da enzima com polímeros iônicos permitiu obter preparações hiperativada.

No entanto, foi necessário selecionar um polímero apropriado e detergente para maximizar os efeitos positivos, e esta seleção deve basear-se em estudos empíricos, devido à complexidade do processo envolvido. Além disso, espera-se que esta estratégia possa ser útil para a obtenção de preparações de lipase hiperativada de outras preparações imobilizadas covalentemente. Neste caso, a incubação em SDS da Lecitase imobilizada seguida por revestimento com PEI melhorou a atividade de 50 vezes, a estabilização da conformação aberta e ativa da lipase, com uma exposição mais elevada da *Ser* catalítica, que pode, pelo menos parcialmente, explicar este aumento na atividade. Outros polímeros, tais como o DS, ou outros detergentes (CTAB e Triton X-100), produziram muito mais reduzidas, e, em alguns casos, mesmo negativos, o efeito sobre a atividade da enzima.

Segundo Santos, *et al.* (2014), a interação do polímero com a proteína pode promover efeitos diferentes, que podem conduzir a uma afinação final das propriedades das enzimas, onde a hidrofilição global da superfície da enzima pode alterar o fechamento/abertura em equilíbrio. Esses polímeros podem gerar alguns empecilhos para os movimentos da tampa, ou pode favorecer a partição de substâncias diferentes. Os efeitos de polímero podem ser diferentes dependendo da sua natureza catiônica ou aniônica, por causa da área envolvida nas interações polímero/enzima.

Capítulo 8

Modificação Química de Lecitase em Fase Sólida: Efeito do Protocolo de Imobilização

Os dados apresentados neste capítulo estão publicados em:

GARCIA-GALAN, CRISTINA; SANTOS, JOSE C. S. DOS; BARBOSA, OVEIMAR; TORRES, RODRIGO; PEREIRA, ERNANDES B.; CORBERAN, VICENTE CORTES; GONÇALVES, LUCIANA R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, ROBERTO. Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry** (1991), v. 49, n.4, p. 604-616, 2014.

DOI: 10.1016/j.procbio.2014.01.028

8.1 Resumo

A Lecitase Ultra, uma fosfolipase quimérica comercializada pela *Novozyme*, foi imobilizada por meio de duas estratégias diferentes: ligação covalente em brometo de cianogênio-agarose e ativação interfacial em octil-agarose. Posteriormente, as preparações imobilizadas foram submetidas a modificações químicas diferentes (aminação, glutaraldeído ou ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS)), a fim de se verificar o efeito destas modificações nas características catalíticas das enzimas imobilizadas, incluindo assim a estabilidade e especificidade para o substrato em diferentes condições. Pode-se afirmar que a imobilização afeta fortemente as características catalíticas das enzimas: já que octil-Lecitase foi mais ativo contra p-nitrofenilbutirato (p-NPB), mas se apresentou menos ativo frente a fenilacetato de metila que as preparações covalentes. Contudo, os efeitos das modificações químicas dependem fortemente da estratégia de imobilização usada. Por exemplo, o uso de um protocolo de imobilização para duas enzimas promoveu um efeito positivo na atividade, enquanto que para a outra enzima foi negativo. A maior parte das modificações apresentou um efeito positivo nas propriedades da enzima, sob certas condições, embora em certos casos, a modificação apresentou um efeito negativo sob outras condições. Por exemplo, a modificação com glutaraldeído da enzima imobilizada ou modificada e aminada, permitiu melhorar a estabilidade da enzima de ambas as preparações imobilizadas, a pH 7 e 9 (em torno de uma 10 vezes), mas apenas a enzima aminada apresentou melhora na estabilidade em pH5. Apesar de alguma reticulação intermolecular ter sido detectada por meio de SDS-PAGE. A aaminação melhorou a estabilidade de octil-Lecitase, ao mesmo tempo em que reduziu a estabilidade da preparação covalente. A modificação com TNBS só melhorou a estabilidade da enzima da preparação covalente a um pH 9 (por um fator de 10 vezes menor).

Palavras-chave: Imobilização de enzimas. Modificação química de enzima. Estabilização de enzima. Hiperativação de enzima. Glutaraldeído. Ácido 2,4,6- trinitrobenzensulfônico.

8.2 Introdução

As Fosfolipases A1 hidrolisam o grupo 1-acilo de um fosfolipídio a um lisofosfolipido e ácidos graxos livres. Elas são de interesse particular para aplicações industriais, como por exemplo, para produzir lisofosfolipido (bons emulsionantes), glicerol com ácido graxo (ácido eicosapentaenoico, ácido linoleico conjugado e ácido docosa-hexaenoico) e degomagem de óleo (HAVN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006; NA *et al.*, 1990; DEVOS *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2006). Devido às suas aplicações interessantes, novas fosfolipases foram selecionados e descobertas nos últimos anos (HARTMAN *et al.*, 2000; HIGGS *et al.*, 1998; MERINO *et al.*, 1999).

Neste contexto, uma nova preparação enzimática com atividade de fosfolipase A1, ou seja, Lecitase® Ultra, foi patenteada e disponibilizada comercialmente (DE MARIA *et al.*, 2007). Segundo a informação da empresa fornecedora, esta é uma preparação obtida a partir da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum* e desenvolvida principalmente para processos de degomagem (DE MARIA *et al.*, 2007). Esta nova enzima apresenta estabilidade de lipase de *T. lanuginosus* e a atividade de uma enzima de *F. oxysporum* (DE MARIA *et al.*, 2007). Contudo, alguns artigos podem ser encontrados na literatura sobre o uso desta interessante enzima (YANG *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2012; LIU, WANG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2007; WANG, *et al.*, 2010).

Assim neste capítulo serão abordados os estudos sobre os efeitos de diferentes modificações químicas, sobre as diversas características catalíticas de Lecitase. Esta enzima, como as lipases, tem um mecanismo catalítico chamado de ativação interfacial, com uma tampa que cobre o centro ativo do meio homogêneo (forma fechada), em equilíbrio com uma forma onde o centro ativo é exposto ao meio (forma aberta) (MILED *et al.*, 2001; DEREWENDA *et al.*, 1994).

Na presença de superfícies hidrofóbicas, tais como gotas de óleo, a forma aberta da lipase fica adsorvida devido a grande bolsa hidrofóbica formada pela face interna da tampa e os arredores do centro ativo (MILED *et al.*, 2001). Estas mudanças conformacionais dão ao sítio ativo das lipases uma grande flexibilidade, sendo relativamente simples para modular suas propriedades (atividade, seletividade ou especificidade) através de diferentes abordagens, como modificação genética (TURNER *et al.*, 2009; KAUR *et al.*, 2006), engenharia de meio (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2004), mas também ferramentas físico-químicas, como a

imobilização ou a modificação química (MATEO *et al.*, 2007; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Propriedades da Lecitase já foram alteradas via imobilização (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007; CABRERA *et al.*, 2008), mas este é o primeiro estudo sobre os efeitos da modificação química nas suas características catalíticas.

A modificação química foi realizada na Lecitase já imobilizada. Isso simplifica o processo, evita a precipitação da proteína, durante ou depois da modificação, e pode mesmo permitir a pré-estabilização da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2011). Além disso, se a hipótese estiver correta, a imobilização é uma maneira de adaptar a conformação da enzima, pode ser possível que a modificação química de diferentes preparações de enzima possam dar resultados muito diferentes. Alguns estudos utilizando lipase B de *Candida antarctica* parecem confirmar essa possibilidade (BARBOSA *et al.*, 2012).

Considerando a primeira possibilidade, duas estratégias de imobilização muito diferentes foram selecionadas. A primeira delas é a imobilização da enzima através da ativação interfacial em octil-agarose (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998), uma maneira de corrigir a forma aberta da Lecitase, deixando o centro ativo e os grupos em torno dele em um ambiente bastante hidrofóbicas (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

A segunda é a imobilização covalente em gel de agarose ativada com brometo de cianogênio (SCHNAPP *et al.*, 1976). Este método de imobilização foi realizado a um pH de 7 e a uma temperatura de 4°C. Sob estas condições, as possibilidades de ligação covalente multipontual são reduzidas (PEDROCHE *et al.*, 2007) e a enzima irá manter a possibilidade de equilíbrio conformacional entre a forma aberta e fechada (DEREWENDA *et al.*, 1994; MILED *et al.*, 2001). À primeira vista, todos os grupos externos, exceto aqueles envolvidos na imobilização, serão suscetíveis à modificação química.

Neste trabalho, três modificações químicas diferentes foram tentadas. A primeira foi à modificação dos ácidos carboxílicos expostos da enzima com etilenodiamina (EDA), após a ativação com carbodiimida (cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) (CARRAWAY *et al.*, 1972; CARRAWAY *et al.*, 1969). Esta modificação mantém a possibilidade de ionização da superfície da enzima, mas produz uma grande alteração das interações iônicas (quebrando pontes iônicas). Esta modificação de proteínas está bem descrita e tem sido usada para modular as propriedades de lipases - por exemplo, especificidade (RODRIGUES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012 e GALVIS *et al.*, 2012).

O pKa do novo grupo amino é de cerca de 9,2, o que faz com que ele seja mais reativo do que o grupo ϵ -amino de lisina (Lys - pKa 10,7), além disso, a adição de todos os grupos carboxílicos externos é na maior parte da proteína, sendo assim, eles passam a ser 2 a 3 vezes mais, em quantidade, do que grupos Lys externos. No entanto, a modificação não é totalmente específica uma vez que foi descrito que a carbodiimida pode transformar alguns grupos carboxílicos de grupos ureia (caso de ataque de amina e os grupos carboxilo ativados não é suficientemente rápido) e também pode modificar resíduos de tirosina (Tyr). Esta última modificação química pode ser invertida por incubação na presença de hidroxilamina, reobtendo Tyr livre (CARRAWAY *et al.*, 1968).

A segunda modificação fora a de grupos amino primários da superfície da proteína, utilizando 2,3,4-trinitrobenzenosulfonato (TNBS). Esta modificação altamente específica, de grupos amino primários, é tradicionalmente empregue para quantificar esses grupos em proteínas e suportes (SNYDER *et al.*, 1975; MENDES *et al.*, 2011). A modificação dos grupos amino da superfície da enzima vai produzir uma hidrofilição da enzima. Ela vai deixar uma amina secundária com um grupo hidrofóbico pendente nele. Este reagente tem sido utilizado com sucesso para detectar a incidência de resíduos de Lys na função de enzimas e proteínas (JAGTAP *et al.*, 2006). No entanto, poucos estudos têm considerado este reagente como uma maneira de modular as propriedades de enzimas, até onde se sabe apenas descreveu-se esta modificação para: invertase (com moderadamente bons resultados em termos de estabilização) (HUSAIN *et al.*, 1996), α -pancreática suína amilase (alterando a especificidade da enzima) (YAMASHITA *et al.*, 1993) e lipase B de *C. antárctica* (alterando a maioria das características catalíticas) (BARBOSA *et al.*, 2012).

A terceira modificação consistiu no tratamento com glutaraldeído. O glutaraldeído é um reagente utilizado para modificar proteínas; envolvendo principalmente grupos amino primários das proteínas, embora possa eventualmente reagir com outros grupos, por exemplo, tióis, fenóis, e imidazoles. (DARTIGUENAVE *et al.*, 2004; WALT *et al.*, 1994; BARBOSA *et al.*, 2014; HABEEB *et al.*, 1968). Além disso, é um agente de reticulação muito eficaz (BARBOSA *et al.*, 2014; WINE *et al.*, 2007). Uma ligação intermolecular é, de longe, mais difícil de conseguir do que a modificação química de um ponto ou uma reticulação intermolecular. Em uma ligação intermolecular, a distância entre os grupos envolvidos deve coincidir com o comprimento do agente de reticulação e, mesmo se a distância for adequada, requer o correto alinhamento dos dois grupos químicos envolvidos, que estão localizados numa superfície rígida da proteína (RODRIGUES *et al.*, 2011). O grau de modificação de

uma superfície aminada por glutaraldeído pode ser facilmente controlada através da utilização de diferentes concentrações de glutaraldeído, os valores de pH da reação e tempo de reação (MONSAN *et al.*, 1978). Demonstrou-se então, que os grupos amino-glutaraldeído são bastante reativos com outros grupos amino ou glutaraldeído com glutaraldeído livre, sendo, assim, a melhor forma de obter uma reticulação com glutaraldeído (BARBOSA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2013).

A reticulação inter ou intra molecular deve sempre provocar certo aumento de rigidez da enzima (WONG *et al.*, 1992), que pode ou não produzir certa estabilização. Por outro lado, um ponto de modificação química com glutaraldeído pode adicionar um grupo relativamente hidrofóbico (BARBOSA *et al.*, 2012) a partir dos grupos amino da enzima, e que podem afetar muito as propriedades físicas globais da superfície da enzima (por exemplo, hidrofobicidade), alterando também as propriedades catalíticas dela.

Assim, como as modificações com glutaraldeído e TNBS, baseiam-se na reação com os grupos amino primários, eles foram também realizados em enzimas anteriormente aminadas, para maximizar os seus possíveis efeitos, por exemplo, ligações cruzadas inter ou intramoleculares.

A hipótese é que essas modificações químicas podem produzir alterações conformacionais gerais na estrutura da enzima ou alterar os movimentos da tampa, em ambos os casos, ajustando as características finais da enzima. Estas alterações podem ser diferentes, dependendo da estratégia de imobilização usada.

8.3 Materiais e Métodos

Lecitase foi obtida a partir da *Novozymes* (Espanha). Octil-agarose e brometo de cianogênio reticulado 4% (CNBr) foram da *GE Healthcare*. Etilenodiamina (EDA), N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (DEC), ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS), glutaraldeído (solução aquosa a 50%), p-nitrofenil butirato (p-NPB), Triton X-100, dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), *R* e *S* metil mandelato e fenilacetato de metilo foram da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA). Glutaraldeído (25% (v/v) estabilizadas em etanol) foi da *Fluka*. Todos os outros reagentes e solventes eram de grau analítico.

8.3.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada através da hidrólise de uma solução 0,4 mM de p-nitrofenilbutirato (p - NPB) em fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 25 °C (sob estas condições $\epsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para iniciar a reação, 50-100 μL de solução de lipase ou de suspensão foi adicionada a 2,55 mL da solução de substrato. A formação do produto, p-nitrofenol, foi acompanhada em espectrofotômetro a 348 nm.

Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de p-NPB por minuto sob as condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e albumina de soro bovino foi utilizada como referência.

Na determinação dos efeitos do valor do pH sobre a atividade da enzima, o protocolo seguido foi semelhante, mas o tampão nas medições foi alterado de acordo com o valor de pH: de acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 6-8 e borato de sódio a pH 9 e pH 10 a 25 °C, todas as preparações eram inteiramente estáveis após incubação durante várias horas em qualquer um destes valores de pH. Em alguns casos, foram usadas diferentes concentrações de alguns detergentes.

8.3.2 Imobilização de Lecitase em octil agarose

Lecitase foi imobilizada em suportes octil-agarose em baixa força iônica (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007). 2,8 mL de extrato comercial (16 mg de proteína/mL, com uma atividade pNPB de 5,6 /mg de proteína) foi diluído em 67,5 mL de tampão fosfato de sódio 5mM a pH 7. Em seguida, adicionaram-se 15g de octil-agarose úmida. A atividade do sobrenadante e suspensão foram seguidas usando pNPB. Depois da imobilização, a suspensão foi filtrada e a lipase suportada foi lavada várias vezes com água destilada.

8.3.3 Imobilização de Lecitase em CNBr agarose

Um volume de 2,8 mL de Lecitase comercial foi diluída em 67,5 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM contendo 0,05% (m/v) de dodecil sulfato de sódio a pH 7, a 4°C. Em seguida, adicionaram-se 15 g de CNBr. A atividade do sobrenadante e da suspensão foi seguida

usando pNPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte em etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Finalmente, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada em abundância.

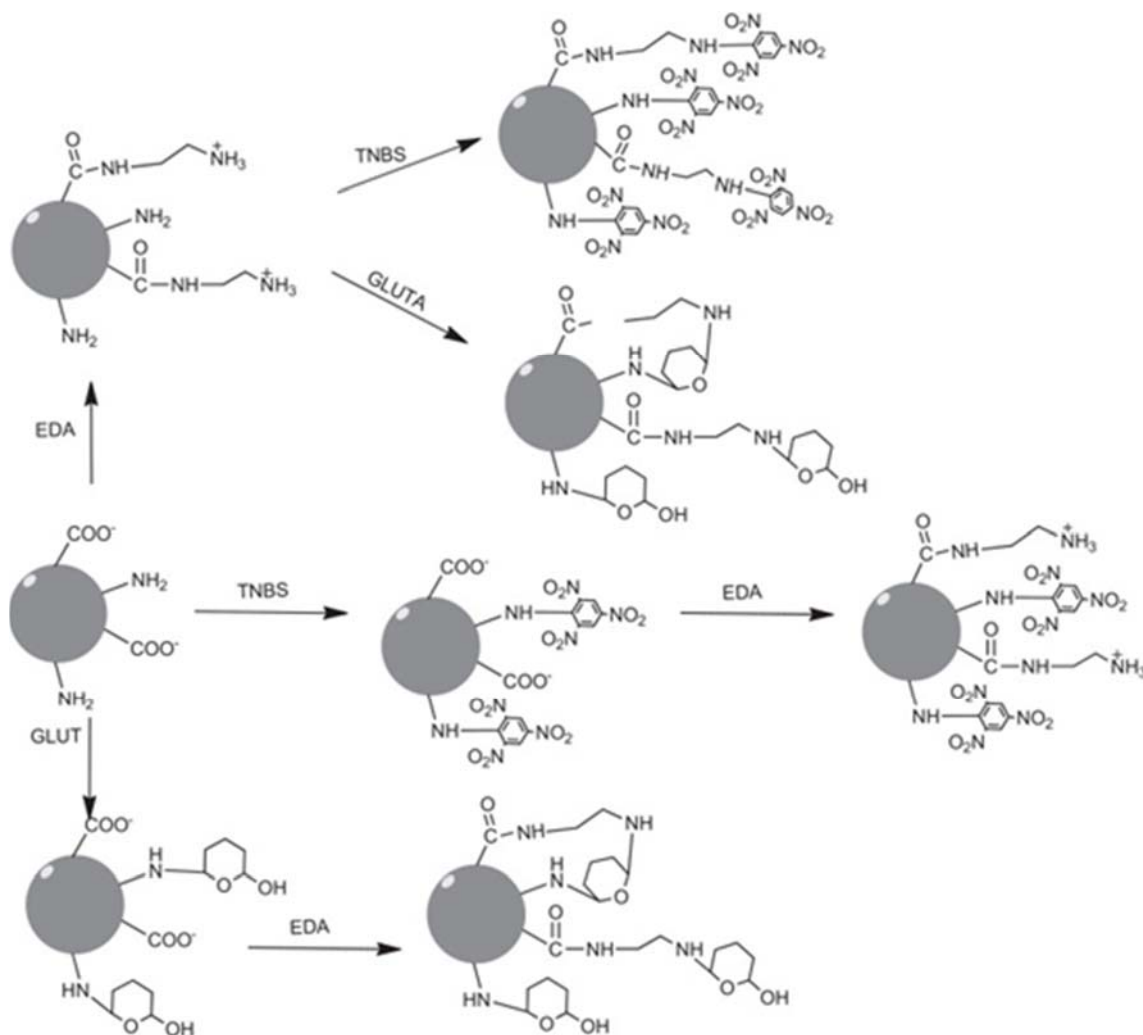
8.3.4 Modificação química de Lecitase imobilizada

A **Figura 8.1** logo mais apresentada, mostra as diferentes modificações químicas realizadas em Lecitase imobilizada e as abreviaturas utilizadas neste estudo.

8.3.4.1 Aminoação em fase sólida de Lecitase

Assim seguindo os dados apresentados na **Figura 8.1**, dez gramas de Lecitase imobilizada, ou Lecitase-TNBS, ou Lecitase-GLU foram adicionadas a 100 mL EDA 1M, a pH 4,75 sob agitação contínua. (GALVIS *et al.*, 2012). A modificação começou com a adição de DEC sólido (para uma concentração final de 10 mM). Após 2 h de agitação suave a 25 °C, os derivados aminados tinham mais do que 95% dos grupos carboxílicos expostos modificados (CARRAWAY *et al.*, 1972; CARRAWAY *et al.*, 1969). Isto foi confirmado através da comparação da cor desenvolvida após titulação com TNBS, que não aumentou utilizando DEC 100 mM ou 2 M EDA. Estas preparações foram lavadas com água destilada e incubadas em 1M de hidroxilamina a pH 8, durante 12 horas para recuperar os resíduos de Tyr, que podem ter sido modificados por DEC (CARRAWAY *et al.*, 1968). Finalmente, as preparações de enzimas imobilizadas foram lavadas com um excesso de água destilada e armazenadas a 4 °C.

Figura 8.1 - Diferentes modificações químicas realizadas neste trabalho. GLUTA: glutaraldeído; TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico; EDA: etilenodiamina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

8.3.4.2 Modificação dos grupos amino primários de Lecitase imobilizada com TNBS

De acordo com a **Figura 8.1** ainda, 12 g de Lecitase imobilizada ou Lecitase - EDA foram adicionadas a 100 mL de uma solução de 0,1 % (m/v) TNBS em tampão fosfato de sódio a pH 8,0 e a mistura foi incubada durante 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a preparação de enzima modificada foi lavada com água destilada (BARBOSA *et al.*, 2012). A cor desenvolvida não aumentou, quando uma concentração e volume de TNBS foram dobrados, o que sugere que 100 % dos grupos amino primários expostos na proteína que tinha sido modificada.

Quando este método foi utilizado para determinar a quantidade de grupos amino primários na proteína, 200 mg foram suspensas em uma cubeta contendo 2,2 mL de tampão borato 100 mM, a pH9 e a absorvância a 430nm foi determinada (Barbosa *et al.*, 2012). Como referência, octil-agarose, ou enzima livre bloqueada com CNBr, foi tratada de uma maneira semelhante.

8.3.4.3 Modificação de Lecitase imobilizada com Glutaraldeído

Lecitase imobilizada (**Figura 8.1**) foi incubada com 0,1% (v/v) de solução de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7 e 25 °C durante 1 h, sob agitação suave. Estas condições permitem modificar completamente os grupos amino primários da enzima com apenas uma molécula de glutaraldeído (Barbosa *et al.*, 2012). A suspensão foi então filtrada e lavada com água para remover o excesso de glutaraldeído.

Em seguida, cinco gramas de Lecitase imobilizada e modificada foram adicionadas a 200 mL de tampão borato de sódio 0,1 M contendo 1 mg /mL de NaBH₄, a pH 8,5 e 4 °C; a mistura foi continuamente agitada durante 30 min. Os biocatalisadores reduzidos foram filtrados e lavados várias vezes com água destilada. Este tratamento produziu um decréscimo de 10% na atividade de CNBr-Lecitase, ao mesmo tempo que não apresentou nenhum efeito na atividade das preparações com octil.

8.3.5 Inativação térmica de diferentes Lecitase imobilizado preparações

Para verificar a estabilidade dos derivados de enzimas, 1 g de enzima imobilizada foi suspensa em 5 ml de tampão acetato de sódio 10 mM a pH 5, fosfato de sódio a pH 7 ou carbonato de sódio, a pH 9, a diferentes temperaturas. Periodicamente, foram retiradas amostras e a atividade foi medida usando pNPB. As meias-vidas foram calculadas a partir dos cursos de inativação observados.

8.3.6 Hidrólise de fenilacetato de metila

A atividade enzimática foi determinada usando o fenilacetato de metila; 200 mg das preparações imobilizadas foram adicionadas a 0,2 mL de 5 mM de substrato em tampão 100 mM contendo 50 % de CH₃CN. O tampão foi acetato de sódio a pH5, fosfato de sódio a

pH 7, e carbonato de sódio a pH 8,5. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C, sob agitação contínua. O grau de conversão foi analisado por RP - HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 centímetros).

As amostras (20 µL) foram injetadas e eluídas a um fluxo de 1,0 mL / min, utilizando acetonitrila, uma solução aquosa de acetato de amónio 10 mM (35:65 , v/v) e pH 2,8, como fase móvel, e detecção por UV foi efetuada a 230 nm . Ácido tem um volume de retenção de 3 ml, enquanto o éster tem um volume de retenção de 12 mL. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mol de ácido fenil acético por minuto sob as condições descritas acima. A atividade foi determinada em triplicada, com um máximo de conversão de 20-30%, e os dados são apresentados como valores médios.

8.3.7 Hidrólise de *R* e *S* mandelato de metilo

A atividade enzimática também foi determinada usando *R* ou *S* mandelato de metila. 400 mg das preparações imobilizadas foram adicionadas a 2 ml de substrato 50 mM em tampão acetato de sódio 100 mM a pH 5, 100 mM de fosfato de sódio a pH 7 ou o carbonato de sódio 100 mM a pH 9 e 25 °C, sob agitação contínua.

O grau de conversão foi analisada por RP - HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 centímetros). Amostras (20 µL) foram injetadas e eluídas a um fluxo de 1,0 mL / min utilizando acetonitrila/tampão acetato de amónio 10 mM (35:65 , v/v) a pH 2,8 como fase móvel. A detecção foi realizada em UV a 230 nm. O ácido tem um volume de retenção de 2,5 ml, enquanto o éster tem um volume de retenção de 10 mL. Uma unidade de atividade enzimática, foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido mandélico por minuto sob as condições descritas acima.

A atividade foi determinada em triplicada, com um máximo de conversão de 20-30 % , e os dados são apresentados como valores médios . Como a reação não é de primeira ordem, a 10 mM, *E* não pode ser calculado a partir de velocidade de reação observada usando o os isômeros *R* e *S* (V_R/V_S), e esta relação direta foi utilizada.

8.3.8 Ensaio de SDS-PAGE

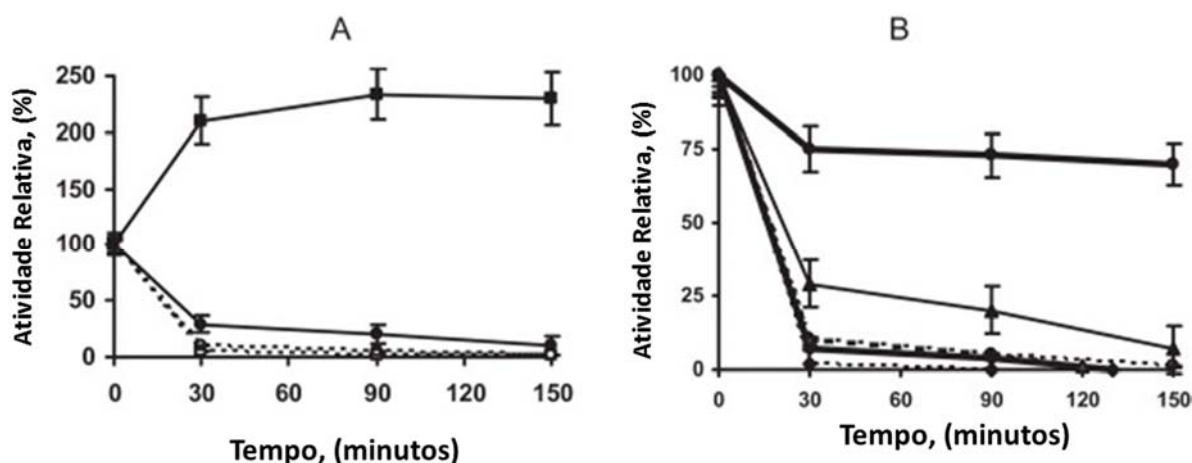
Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli (1970) com uma tetra-célula Miniprotean (Biorad), 12% de gel de corrida de uma zona de separação de 9 cm × 6 cm, e uma zona de concentração de 5% de poliacrilamida. Cem miligramas de amostras de enzimas imobilizadas foram suspensas em 1mL de tampão de ruptura (2% de SDS e 10% de mercaptoetanol), fervidas durante 5 minutos e uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi utilizada nas experiências. Os géis foram corados com Azul de Coomassie. Marcadores de baixo peso molecular da marca Fermentas foram usados (10-200 kDa).

8.4 Resultados

8.4.1 Imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr

A **Figura. 8.2A** mostra o curso de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr-agarose.

Figura 8.2 - Cursos de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr. As condições experimentais estão detalhadas na Seção 3.1. (A) Imobilização, na ausência de SDS. Quadrados: octil-agarose; círculos: CNBr-agarose. As linhas sólidas: suspensão, as linhas tracejadas: sobrenadantes. (B) Efeito de SDS sobre os cursos de imobilização de Lecitase em CNBr-agarose. Triângulos: 0,05% SDS (v/v); Losango: SDS a 0,1% (v/v).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em octil-agarose, a maior parte da enzima já está imobilizada depois de 0,5 h, e o aumento da atividade é mais do que um fator de 2 vezes. Quando a imobilização da enzima

ocorre em CNBr, esta é rapidamente incorporada no suporte (mais do que 90%), mas a atividade sofre uma queda drástica (menos do que 5% da atividade inicial é observada no suporte). A inativação da enzima segue próxima a imobilização. Isto é surpreendente, já que as condições de imobilização são muito leves e não se esperava uma reação tão intensa entre enzima/suporte.

Tentando melhorar a recuperação da atividade enzimática em CNBr, foram realizados ensaios com vários detergentes, tentando encontrar um que poderia manter a forma aberta da Lecitase e manter a enzima na forma monomérica (PALOMO *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003), tendo um baixo impacto sobre a sua estabilidade.

Verificou-se que o SDS era o único com um menor efeito sobre a estabilidade da Lecitase. A **Figura 8.2B**, nos possibilita observar que o efeito da presença de diferentes concentrações de SDS sob os valores de atividade durante a imobilização da enzima. A imobilização permaneceu muito elevada uma vez que a atividade residual no sobrenadante foi baixa, e usando 0,05 % de SDS durante a imobilização, em torno de 70% da atividade inicial da enzima depois de 2,5h de imobilização foram recuperados, este resultado se vê na curva da suspensão da figura 8.2B.

Os efeitos do detergente podem ser vários. Por um lado, algumas áreas da enzima podiam ser bloqueadas por este detergente, dessa forma evitando a imobilização por essa área, até mesmo impedir a reação de alguns grupos. Por outro lado, um detergente pode estabilizar a forma aberta da lipase, se o problema depois da imobilização em CNBr é a dificuldade para a abertura da forma da enzima, a imobilização na presença de detergente pode resolver isto (PALOMO *et al.*, 2003). Além disso, se Lecitase tende a formar dímeros (como muitas lipases fazem (PALOMO *et al.*, 2003; PALOMO *et al.*, 2003)), o detergente irá quebrá-los, permitindo assim a imobilização da forma monomérica da enzima. Estas condições de imobilização foram utilizadas como padrão para a preparação dos biocatalisadores utilizados neste trabalho.

8.4.2 Efeito das modificações químicas sobre a atividade da enzima

Ambas as preparações enzimáticas foram submetidos a modificações químicas como fora mostrado na **Figura 8.1**. O efeito sobre a atividade da enzima em condições padrão pode ser encontrado na **Tabela 8.1**.

Tabela 8.1 - Efeito das modificações químicas sobre as atividades frente a pNPB das diferentes preparações. A atividade foi determinada a pH 7 e 25 °C, tal como indicado no ponto 2. GLUTA, glutaraldeído. A atividade é determinada como U/mg.

Modificação química	Biocatalisador	
	Octil-Lecitase	CNBr-Lecitase
Nenhuma	26 ± 1	0.9 ± 0.05
EDA	35 ± 1	1.1 ± 0.05
TNBS	12.5 ± 0.5	2.4 ± 0.1
GLUTA	18. ± 1	0.54 ± 0.04
EDA-TNBS	20.5 ± 1	0.45 ± 0.03
EDA-GLUTA	16.5 ± 1	0.26 ± 0.02
TNBS-EDA	11.5 ± 0.6	0.32 ± 0.02
GLUTA-EDA	15.2 ± 1	0.4 ± 0.03

Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando octil-Lecitase, a aminação produziu um aumento na atividade da enzima (em cerca de 35%), enquanto que com TNBS (foram cerca de 50% de recuperação da atividade) e com glutaraldeído produziu uma diminuição (cerca de 70%) da atividade da enzima.

A modificação da enzima aminada com TNBS diminuiu a atividade em 40%, ligeiramente menor do que modificando o derivado inalterado de octil-Lecitase, embora agora o número de grupos modificados seja muito maior. O tratamento deste biocatalisador com glutaraldeído reduziu a atividade em cerca de 50%, na verdade, esta modificação reverteu o efeito positivo da aminação e foi menos ativa do que a enzima apenas modificada com glutaraldeído.

Por outro lado, a aminação da enzima modificada com TNBS ou glutaraldeído causou uma ligeira diminuição da atividade enzimática. A situação foi diferente usando a enzima imobilizada covalentemente. Em primeiro lugar, a atividade inicial é muito mais baixa que usando octil-agarose, quase um fator de 30 vezes (medidas agora são realizadas em ausência de detergente).

Aminação produziu uma ligeira melhoria na atividade da enzima, enquanto a modificação com glutaraldeído diminuiu a atividade em 40%. No entanto, a modificação com TNBS aumentou a atividade em mais do que um fator de 2,5 vezes. O glutaraldeído ou

tratamento de TNBS da enzima aminada produziu uma redução severa na atividade da enzima (cerca de 20 e 40% de recuperação da atividade, respectivamente), muito mais expressiva do que utilizando a enzima não modificada.

A aminação da enzima modificada com TNBS produziu a perda de todo o efeito positivo da modificação com TNBS, e até mesmo promoveu uma redução ainda maior na atividade enzimática (atividade caiu 2,5 - 0,32 U/mg). Isto é inesperado, considerando que ambas as modificações independentes têm efeitos positivos sobre a atividade da enzima. A aminação da enzima modificada com glutaraldeído também teve um efeito negativo na atividade, mas não tão negativo. Assim, os efeitos das modificações químicas nas propriedades da enzima dependem fortemente da estratégia de imobilização, e elas não são necessariamente aditivas, em alguns casos, sucessivas modificações tem um impacto menor sobre a atividade da enzima que em cada uma das modificações individuais ou até mesmo efeito oposto.

Considerando-se que para alterar o delicado equilíbrio de forças que estabilizam a forma aberta da lipase, uma explicação específica para cada um dos os resultados individuais pode ser quase impossível. No entanto, as diferenças nas preparações imobilizadas podem ser pelo menos uma explicação parcial para o efeito diferente da modificação química nos derivados de Lecitase imobilizada de forma covalente e adsorção interfacial.

Em Lecitase imobilizada em octil-agarose foi estabilizada a forma aberta, isto significa que qualquer efeito na modificação química fundada sobre as mudanças no equilíbrio aberta/fechada será minimizado agora. Além disso, a área com molécula da enzima imobilizada está em estreito contato com a superfície hidrofóbica do suporte, e este pode alterar a sua reatividade (em alguns casos, pode ser que o grupo não é acessível para a modificação, em outros, alguma partição pode aumentar ou diminuir sua aparente reatividade). Para aumentar a informação sobre o efeito da modificação da atividade da enzima, estudou-se a atividade em pH5 a pH10.

8.4.3 Efeito do pH sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase

A **Figura 8.3** mostra o perfil de atividade das preparações de octil- e CNBr-Lecitase em função do pH. Os perfis são muito diferentes. Embora a enzima imobilizada covalentemente apresente claramente um ótimo de atividade a pH 6 e retenha apenas cerca de

40% de atividade a pH 10, o derivado octil-Lecitase não tem um valor de pH ótimo claro no intervalo estudado, atividade em um plano a partir de pH 8-10, com uma certa tendência para aumentar a atividade até ao valor de pH mais elevado analisado (valores de pH mais elevados apresentavam uma hidrólise química muito rápida do substrato pNPB, o que inviabiliza a correta interpretação dos dados).

Considerando que o derivado octil-Lecitase já está estabilizado, coma forma aberta da enzima, a importância do valor de pH com o derivado de CNBr pode ser uma explicação provável para estes resultados muito diferentes. Em relação ao efeito das modificações químicas em que este perfil, é muito diversificado.

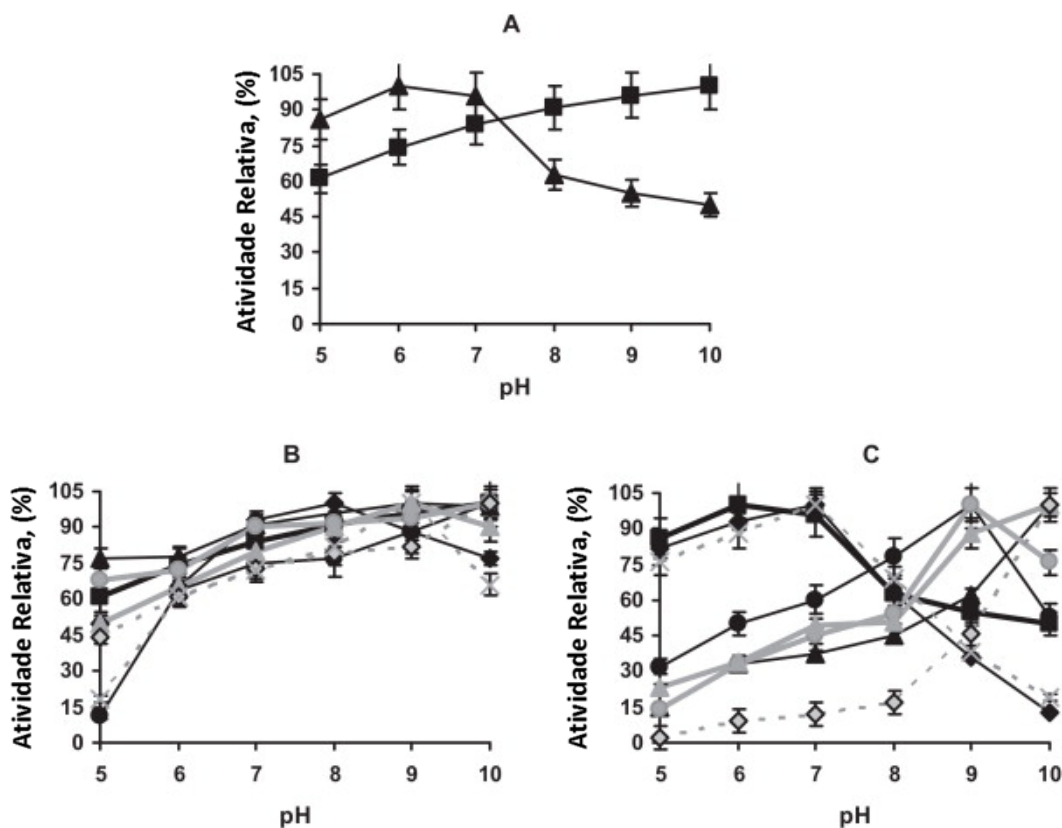
Primeiro, vamos concentrar-nos sobre os derivados com octil (**Figura 8.3B**). A aaminação promoveu pouca modificação, uma vez que o perfil permaneceu inalterado. Isso foi muito surpreendente, considerando a mudança radical das interações iônicas comparando a enzima modificada e não modificada, e a mudança dramática que esta modificação química deve produzir sobre a forma como o pH pode afetar essas interações.

A modificação com TNBS ocasionou a diminuição da atividade a valores de pH inferiores a 8 e o efeito é mais significativo a valores de pH ácido (a pH 5 os derivados de octil modificados com TNBS mantiveram apenas 15% da atividade, enquanto o derivado não modificado manteve 61%). A modificação com glutaraldeído produziu um perfil de atividade /pH mais estreito, com uma atividade máxima em pH 8, com uma redução mais significativa da atividade, tanto em valores ácido como em básicos de pH.

A aaminação da preparação TNBS-Lecitase promoveu certa recuperação da atividade a valor de pH ácido (cerca de 50 % de retenção da atividade a pH 5). No entanto, o efeito da aaminação é claramente negativo para a atividade da preparação modificada com glutaraldeído em valor de pH ácido (ocorre diminuição na atividade de 50 % a 15 % , a pH 5). Nota-se ainda queo pH ótimo da preparação com glutaraldeído muda de 8 a 9.

A modificação com TNBS da enzima aminada tem quase nenhum efeito sobre o perfil de atividade /pH . E a modificação com glutaraldeído da enzima aminada tem um efeito sobre o perfil atividade /pH semelhante a modificação da preparação octil não modificada, mas deixando um valor de pH ótimo claro a pH 9.

Figura 8.3 - Efeito do pH sobre a atividade frente a pNPB das diferentes preparações de Lecitase. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 (A) Efeito do protocolo de imobilização: octil-Lecitase: Quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos. (B) (octil-Lecitase) e (C), (CNBr-Lecitase). Efeito da modificação química. *Uma modificação:* linhas pretas sólidas. Quadrados: Nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, losango: GLUTA. *Modificação da Lecitase aminada:* linhas cinza sólidas. Círculo cinza: TNBS, Círculo: GLUTA. *Aminação de Lecitase modificada:* linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruz Cinzenta: GLUTA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A **Figura 8.3C** mostra o efeito das modificações sobre o pH /atividade de Lecitase imobilizada sobre CNBr. Neste caso, as alterações são muito mais evidentes do que quando se utiliza octil-Lecitase. A aminação fez com que a atividade máxima fosse observada no valor mais elevado de pH estudado, o pH 10. Sob estas condições, a atividade absoluta da enzima modificada foi 6 vezes maior do que a da enzima não modificada (0,5 contra 3 U/mg de enzima). No entanto, no pH de 5, a modificação reduziu a atividade da enzima em cerca de um fator de 2 vezes.

A modificação com TNBS provocou uma variação no valor ótimo de pH, de 6 a pH 9 (a este valor de pH da modificação aumentou 8 vezes a atividade enzimática, entre 0,5 e 4 U/ mg). Na faixa de pH ácido, esta diferença é mais curta (por exemplo, a um pH de 5 foi de 0,8 a 1,3). A modificação com glutaraldeído produziu um ligeiro desvio do valor de pH

ótimo (até pH 7), com redução muito significativa da atividade nos valores de pH alcalinos (pH 10 a atividade diminuiu após a modificação de 0,5 a 0,08).

A aminação da enzima modificada com TNBS deslocou para pH 10 a máxima a atividade. Neste valor de pH, a aminação produziu um incremento da atividade da enzima (de 2,1 a 2,6 U/mg), que é cinco vezes maior do que a da enzima não modificada (0,5 U / mg). No entanto, a pHs ácidos, o efeito é muito negativo, a pH 5, por exemplo, a atividade foi de 1,3 a 0,06, mais baixa do que a da enzima apenas aminada (0,8 U/mg). A aminação da Lecitase modificada com glutaraldeído não tem um claro efeito sobre o perfil de atividade em função do pH, apenas um melhor desempenho em valores de pH alcalino (na verdade, as atividades tornam-se idênticas a pH 10).

O tratamento da enzima aminada com TNBS não afetou o valor de pH ótimo; mas a atividade diminuiu em valores de pH mais alcalinos ou ácidos, resultando em uma curva estreita. Usando glutaraldeído na enzima aminada, o perfil de atividade/ em função do pH permaneceu quase inalterado.

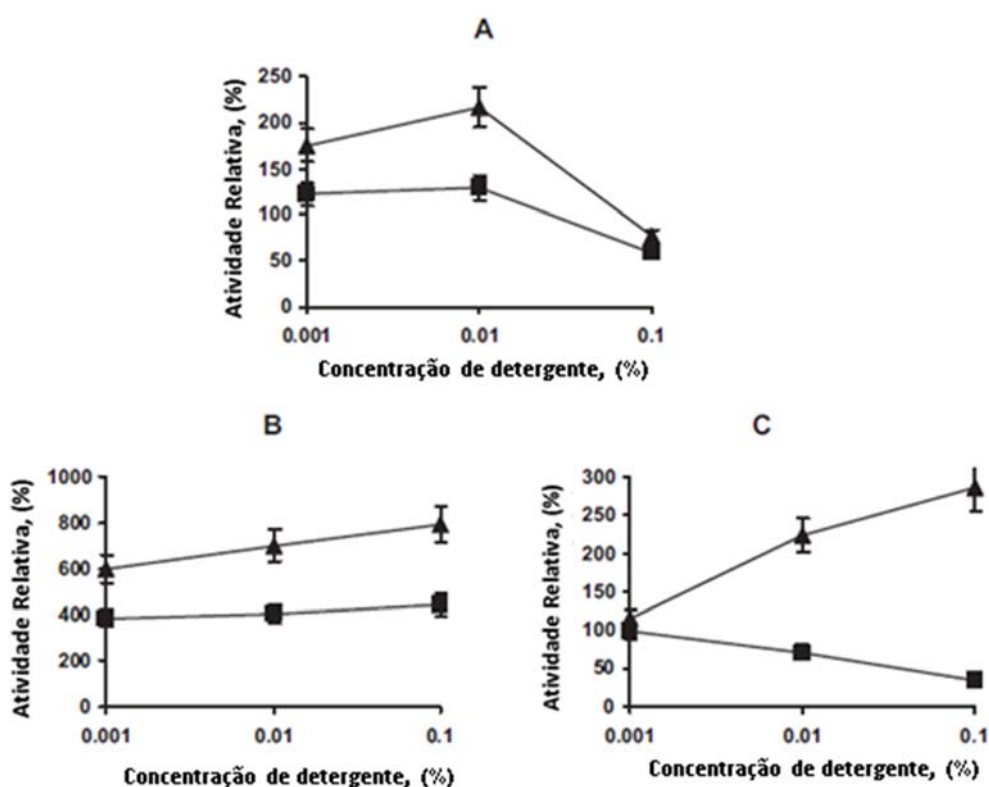
Os resultados obtidos mostram como o efeito de uma modificação química é fortemente dependente do valor de pH, algumas modificações positivas a um valor de pH, podem se tornar muito negativas em outro. O efeito do pH sobre a atividade da enzima depende da estratégia empregada na imobilização; algumas explicações prováveis foram detalhadas anteriormente.

8.4.4 Efeito da presença de detergentes na atividade da enzima

As **Figuras 8.4, 8.5 e 8.6** mostram o efeito da presença de diferentes concentrações de detergentes sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase imobilizada. O efeito do detergente sobre a atividade da enzima pode ser devido a razões diferentes. Em primeiro lugar, pode estabilizar a forma aberta da lipase (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006). Em segundo lugar, o detergente pode alterar a conformação da enzima, gerar sua inativação ou hiperativação, e também produzir uma desestabilização (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007; MOGENSEN *et al.*, 2005). Além disso, o detergente pode atuar como um inibidor competitivo (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Assim, não é provável que para cada preparação enzimática (que esperamos ter uma conformação alterada) o efeito de um detergente pode ser inteiramente diferente, por exemplo, as preparações com octil não pode sofrer ativação por estabilização da enzima pela forma aberta, uma vez que ela já está imobilizada e estabilizada nessa forma (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Figura 8.4 - Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de Lecitase imobilizada. Os experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2. Octil-Lecitase: quadrados; CNBr-Lecitase: triângulos.



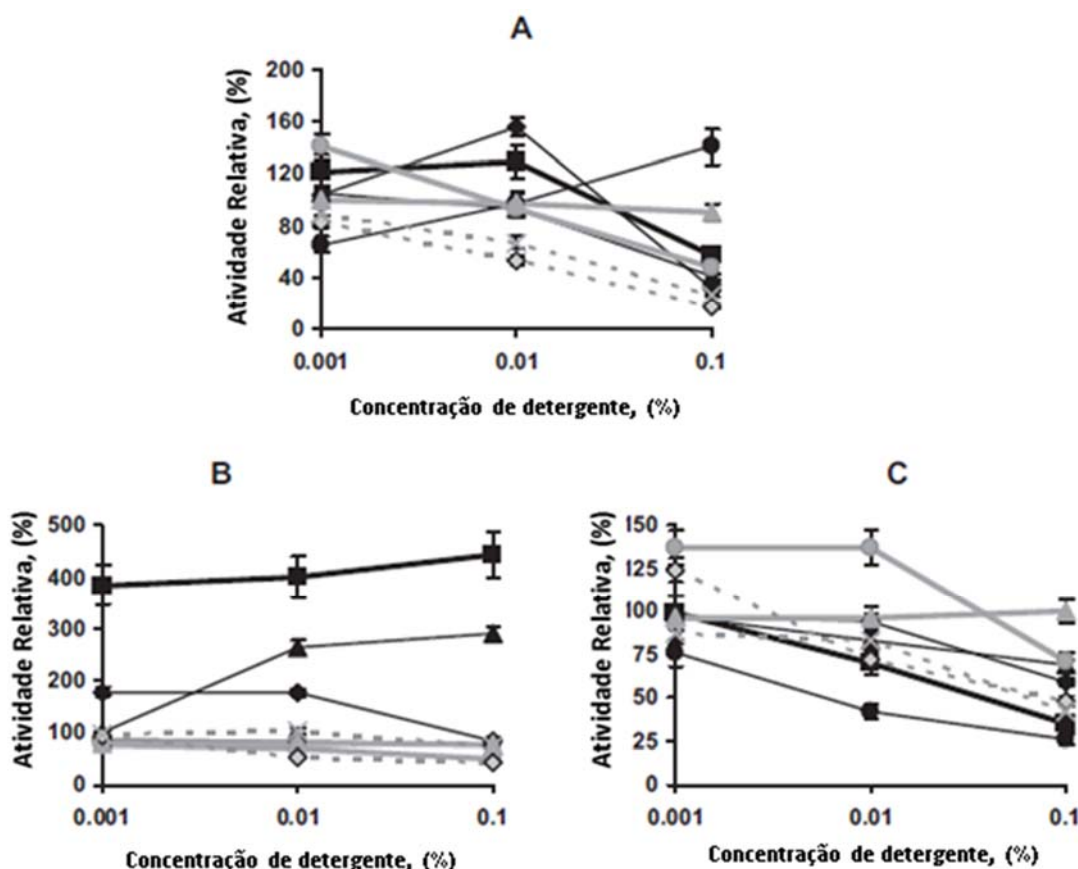
Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando SDS (0,001 a 0,01% (v/v) o derivado octil-Lecitase teve um aumento na atividade (Figura 3.4A) de 120%, enquanto que usando 0,1% de SDS ocorreu diminuição da atividade em 60% (não ocorreu dessorção da enzima utilizando estas concentrações de detergente, concentração de proteína foi determinada usando pelo método de Bradford). Usando CNBr-Lecitase, o incremento da atividade é mais significativo e atinge um máximo

quando usando 0,01% de SDS (mais de 215%), reduzindo para 75% quando se usou 0,1% de detergente.

As diferenças entre as duas preparações imobilizadas seguem a tendência esperada, um efeito maior sobre o CNBr-Lecitase que no octil-Lecitase foi observado. Em seguida, foi analisado se a modificação química pode alterar o efeito do detergente, considerando a sua natureza aniônica.

Figura 8.5 - Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de octil-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 *Uma modificação*: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. *Modificação da Lecitase aminada*: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. Aminoação de Lecitase modificada: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Começando com as preparações com octil (**Figura 8.5A**), a aminoação parece evitar o efeito positivo do SDS na atividade enzimática, e ainda produz uma diminuição na

atividade da enzima em concentrações mais baixas de SDS (por exemplo, a 0,01% (v/v), a atividade está em 90%, enquanto antes era de 120%). A modificação com TNBS provocou um efeito positivo do SDS, foi detectada na maior concentração usada (0,1%), enquanto o tratamento de glutaraldeído não teve quase nenhum efeito sobre o SDS sobre a atividade da enzima.

A aminação da enzima modificada com glutaraldeído elimina os efeitos positivos do SDS na enzima modificado com glutaraldeído, enquanto que a aminação da enzima modificado com TNBS aumenta os efeitos negativos do SDS sobre a enzima modificada com TNBS. O tratamento com glutaraldeído da enzima aminada permitiu manter em torno de 100%, quando utilizando SDS entre 0,001 a 0,1% (v/v), enquanto que o tratamento com TNBS deu como resultado uma atividade enzimática com um comportamento muito semelhante ao da enzima não modificada.

Usando CNBr-Lecitase, os resultados são diferentes (**Figura 8.6A**). A aminação promoveu uma diminuição na atividade da enzima em concentrações mais baixas de SDS; enquanto que a modificação com TNBS causou um efeito positivo com SDS, duplicando a atividade da enzima na máxima quantidade de SDS utilizada neste estudo (0,1%, v/v). A enzima modificada com Glutaraldeído diminuiu progressivamente a atividade para todas as concentrações de SDS analisadas.

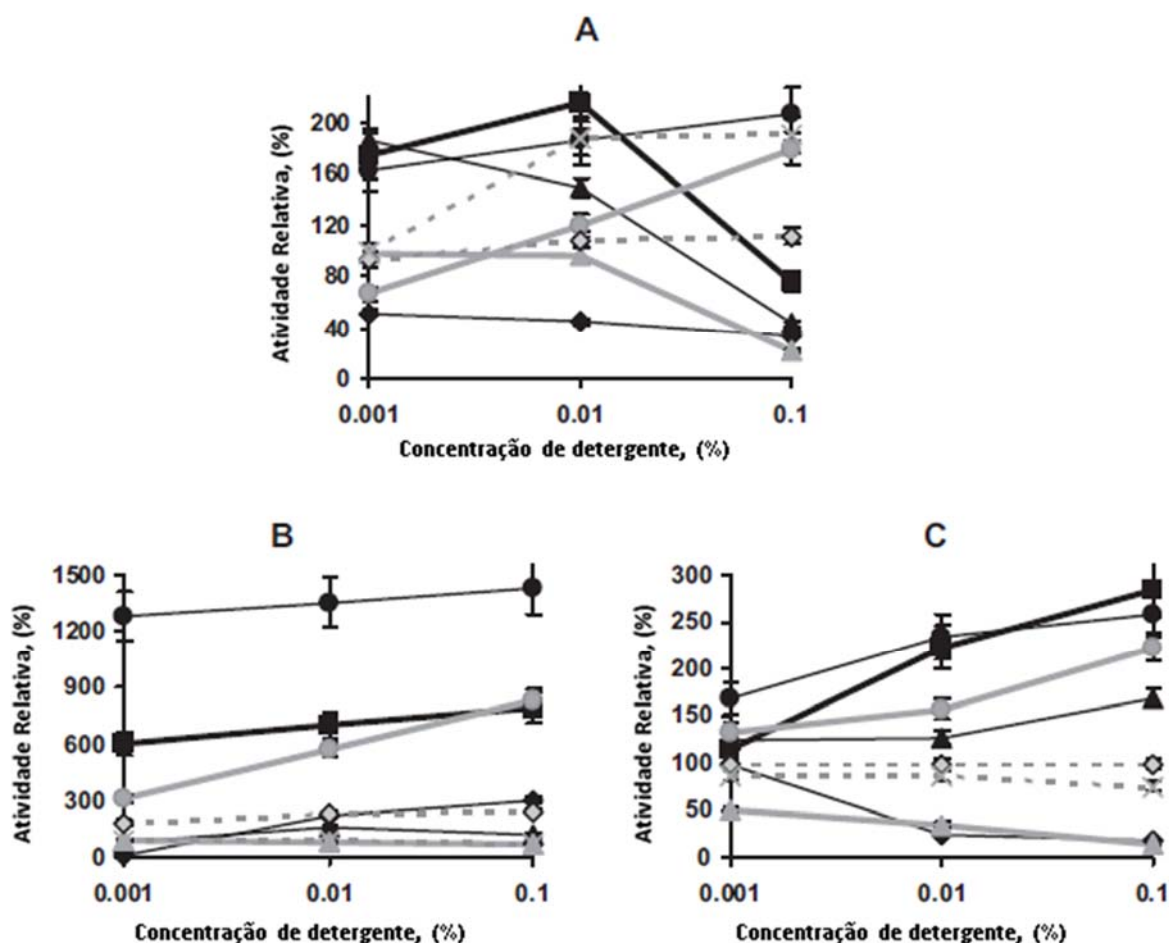
A aminação da enzima modificada com TNBS não apresentou influencia sobre a atividade enzimática pela presença de SDS, contudo quando se usou a enzima modificada com glutaraldeído, a aminação impediu o decréscimo de atividade no intervalo de 0,001 e 0,01 % de SDS, mas não a 0,1%. A modificação com TNBS da enzima aminada teve um efeito semelhante para a mesma alteração na enzima imobilizada e não modificada (atividade máxima foi detectada com SDS a 0,1%), enquanto a modificação com glutaraldeído permitiu melhorar a atividade em elevada concentração de SDS (desde 44 % de aumento de atividade até 190 % usando 0,1 % de SDS).

O CTAB, um detergente catiônico que pode ajudar a compreender os efeitos dos outros detergentes, foi utilizado, embora se tenha verificado que a incubação em longo prazo de soluções de Lecitase com este detergente diminuiu sua atividade. No entanto, em poucos minutos, em geral o tempo para se determinar a atividade, esta inativação é completamente negligenciável na faixa de concentrações estudadas.

Para o octil-Lecitase (Figura 4B), a atividade aumentou para mais de 440% usando 0,1% de CTAB, a concentração máxima utilizada (em que a enzima não foi

encontrada em solução, ou seja não ocorreu dessorção). Usando CNBr, o incremento da atividade chegou a um fator de 8 vezes. Assim, CTAB apresentou um mesmo efeito mais positivo sobre a atividade da enzima em comparação com SDS, utilizando ambas as preparações imobilizadas. Em seguida, analisamos o efeito da modificação química na atividade da enzima na presença de CTAB (Figuras. 3.5B e 3.6B). A maioria das modificações reduziu os efeitos positivos de CTAB sobre a atividade da enzima para ambas as preparações imobilizadas.

Figura 8.6 - Efeito de diferentes detergentes (A: SDS, B: CTAB, C: Triton X-100) sobre a atividade (pNPB) de diferentes preparações de CNBr-Lecitase modificada. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 *Uma modificação*: Linhas pretas sólidas. Quadrados: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, Losango: GLUTA. *Modificação da Lecitase aminada*: linhas cinza Sólidas. Círculos Cinza: TNBS, Círculos: GLUTA. *Aminação de Lecitase modificada*: linhas cinza tracejada. Losango cinza: TNBS, Cruzes cinzenta: GLUTA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Usando o derivado aminado de octil-Lecitase (**Figura 8.5B**), o aumento da atividade também foi observado em todas as concentrações de CTAB estudadas, mas com um máximo de 0,1% (v/v) de CTAB o incremento foi de 290%. Contudo, após a modificação com TNBS, a enzima diminuiu progressivamente a sua atividade com o aumento da concentração de CTAB.

A modificação com glutaraldeído, também reduziu os efeitos positivos do CTAB, apenas 85% da atividade inicial foi observada com 0,1% de detergente. A aminação desta preparação quase não tem influência sobre o efeito do detergente, enquanto que, nas preparações com TNBS aminadas ocorreu diminuição da atividade com a concentração de CTAB (para menos de 45% com 0,1% de CTAB, cerca de 7 vezes menor do que enzima imobilizada sem modificação). Ambas as modificações da enzima aminada também eliminaram o efeito positivo do CTAB (**Figura 8.5B**).

Usando a preparação imobilizada de forma covalente (**Figura 8.6B**), a aminação diminuiu fortemente o efeito positivo de CTAB na atividade enzimática, na verdade, a ativação máxima (apenas 160%) se observa com 0,01%, com uma diminuição na atividade da enzima em 0,1% de detergente. A modificação com glutaraldeído reduziu o efeito, mas ainda assim a hiperativação foi significativa e a atividade máxima é obtida em 0,1%.

O resultado mais favorável foi obtido usando TNBS, quando a atividade cresceu progressivamente até chegar a um aumento de 1.500%, considerando que essa preparação já foi 2,5 mais ativas do que a enzima sem modificação, a atividade final com 0,1% CTAB é quase 5 vezes maior ao utilizar esta enzima modificada do que usando a enzima sem modificações (em valores absolutos) foi usada.

A modificação da enzima aminada com TNBS também melhorou significativamente o desempenho da enzima na presença de CTAB, ocorreu uma hiperativação de 8,5 vezes em 0,1% de detergente. Já a modificação com glutaraldeído da enzima aminada em presença de CTAB apresentou um ligeiro efeito negativo sobre a atividade da enzima (mais do que 70% utilizando 0,1% de CTAB, **Figura 8B**).

A aminação da enzima modificada com TNBS produziu uma diminuição na hiperativação provocada pelo CTAB, mas o valor máximo ainda foi observado quando utilizando 0,1% de CTAB. Assim aaminação da enzima modificada com glutaraldeído produziu uma insensibilidade moderada na enzima para com os efeitos do CTAB (uma diminuição progressiva leve na atividade, até atingir 80% utilizando 0,1% de CTAB).

Finalmente, analisou-se o efeito de um detergente não iônico na atividade enzimática das diferentes preparações, Triton X-100 (**Figuras 8.4C, 8.5C e 8.6C**). O derivado octil-Lecitase diminuiu progressivamente a atividade enzimática na presença de Triton (atividade é apenas de 30% em 0,1% de detergente (v/v)) (**Figura 8.4C**). Contudo, com CNBr- Lecitase ocorreu aumento significativo na atividade de maneira progressiva quando Triton foi adicionado ao meio (a hiperativação foi quase de 3 vezes a 0,1% de detergente) (**Figura 8.4C**).

Considerando o uso do octil- Lecitase (**Figura 8.5C**), a aaminação reduziu o efeito negativo da presença de detergente sobre a atividade da enzima (70% de atividade em 0,1% de detergente), a modificação com glutaraldeído não teve nenhum efeito sobre a atividade da enzima e somente quando usando 0,1% de detergente produziu uma clara diminuição na atividade da enzimática, enquanto que o TNBS fez que a atividade da enzima diminuísse rapidamente na presença deste detergente, com um 25 % de atividade residual em 0,1% de Triton.

Curiosamente, a aaminação desta preparação modificada com TNBS permitiu observar certo aumento da atividade da enzima na presença de baixa concentração de Triton (140%, utilizando 0,001% de detergente), e reduziu os efeitos negativos em concentrações de detergente mais elevadas (50%, quando utilizando 0,1% de detergente) (**Figura 8C**). A aaminação da enzima modificada com glutaraldeído teve quase nenhuma influência sobre o efeito do Triton X - 100 na atividade da enzima.

Por outro lado, a modificação com TNBS da enzima aminada permitiu ter certa hiperativação quando usando 0,001 e 0,01 % de detergente (cerca de 1,4 vezes) , mas na presença de 0,1 % de detergente a atividade relativa foi muito semelhante a enzima unicamente aminada . A modificação com glutaraldeído desta enzima aminada, no entanto, permitiu manter a atividade da enzima inalterada em toda a gama de [Triton X - 100] estudada, apresentando maior atividade quando usando 0,1% de detergente (**Figura 8.5C**).

Usando a preparação covalente (**Figura 8.6C**), a aaminação permitiu obter um desempenho semelhante na atividade da enzima com baixa concentração de detergente, enquanto a hiperativação em concentrações mais elevadas foi menor. A modificação com glutaraldeído causou uma diminuição drástica na atividade da enzima na presença deste detergente (15 % com 0,1 % de detergente), enquanto a modificação com TNBS quase deixou o efeito desse detergente na atividade enzimática inalterada (**Figura 8.6C**).

A aminação com glutaraldeído da enzima modificada reverteu parcialmente os efeitos muito negativos da modificação com glutaraldeído, enquanto a aminação da enzima modificada com TNBS não produziu nenhum efeito em todas as faixas de concentrações de detergente estudada. A modificação da enzima aminada com TNBS recuperou o efeito do triton sobre a atividade da enzima modificada ou enzima modificada apenas com TNBS, revertendo à ausência do efeito da aminação. No entanto, a modificação com glutaraldeído da enzima aminada aumentou o efeito negativo de Triton X - 100 sobre a atividade da enzima (**Figura 8.6C**).

Os resultados sugerem que os efeitos positivos do detergente podem não estar baseados apenas na estabilização da forma aberta da enzima, mas também em algumas mudanças conformacionais "globais", como a hiperativação apresentada em alguns casos para os derivados com octil, na presença de detergentes, menor do que com os derivados em CNBr mas bastante significativa ainda.

O uso de enzimas enriquecidas com grupos catiônicos ou com grupos mais hidrofóbicos pendent na sua estrutura modifica significativamente o efeito dos detergentes. No entanto, regras não podem ser observadas. Aminação da enzima deveria aumentar o número de moléculas de SDS que interage com a enzima, tornando a interação do detergente catiônico mais difícil. Isto pode produzir efeitos semelhantes usando concentrações muito baixas de SDS, mas exige uma maior quantidade de CTAB.

No entanto, esta tendência não é geralmente observada. A modificação com TNBS deveria produzir um efeito semelhante com todos os detergentes uma vez que novos grupos hidrofóbicos foram introduzidos na enzima. Contudo, em alguns casos esta modificação reduz os efeitos dos detergentes, enquanto em outros produz aumentos sobre a atividade da enzima.

O glutaraldeído deve aumentar a rigidez da enzima (se algumas ligações cruzadas inter- ou intramoleculares são formadas) (BARBOSA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2012), o que pode tornar a enzima menos sensível à ação dos detergentes. No entanto, neste estudo, isto foi observado em alguns casos, enquanto que em outros casos, a modificação com glutaraldeído aumentou principalmente os efeitos negativos frente aos detergentes.

8.4.5 Estabilidade Térmica

A modificação química da superfície da proteína pode produzir algumas alterações inesperadas na estabilidade da enzima (BARBOSA *et al.*, 2012). Aquelas alterações na estabilidade da enzima podem depender das condições da inativação (por exemplo, o valor de pH), principalmente, considerando as mudanças na enzima ionização ou equilíbrio hidrofobicidade/hidrofobilidade (RODRIGUES *et al.*, 2011).

A **Tabela 8.2** mostra a meia-vida das preparações enzimáticas sob diferentes condições. A temperatura foi selecionada de acordo com a estabilidade da enzima, sob os diferentes valores de pH.

Tabela 8.2 - Estabilidade térmica das diferentes preparações de enzimas modificados dadas como meia-vida em minutos. As temperaturas foram 55 °C em pH 7, 53 °C em pH 9 e pH 5 e 49 °C. Outras especificações estão descritas na Seção 2.

Modificação química	Biocatalisador/pH					
	Octil/pH5	Octil/pH7	Octil/pH9	CNBr/pH5	CNBr/pH7	CNBr/pH9
Nenhuma	267 ± 15	48 ± 3	37±3	60±3	63±3	40±3
EDA	406 ± 20	180 ± 10	112±9	60±4	56±3	29±2
TNBS	28 ± 1	22 ± 1	22±12	60±5	30±2	542±30
GLUTA	120 ± 5	154 ±10	511±30	11±1	30±2	42±3
EDA-TNBS	36 ± 1	26 ±1	27 ± 4	311±20	230±20	259±20
EDA-GLUTA	315 ± 10	191 ±10	278 ±15	364±25	120±10	41±4
TNBS-EDA	65 ± 4	34 ±2	37 ±2	34±3	40±3	43±2
GLUTA-EDA	366 ± 20	279 ±20	239 ±15	110±9	44±4	41±3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em pH 7 e 55 °C, a preparação covalente é ligeiramente mais estável do que a imobilizada em octil-Lecitase (meias-vidas de 63 e 48 min), enquanto que a pH 5 e 50 °C, a preparação em octil-agarose é muito mais estável (meias-vidas de 60 e 267 min) e em 53 °C e pH 9, as duas preparações são quase idênticas (cerca de 40 min). Isso já foi verificado com algumas lipases que quando imobilizadas interfacialmente são mais estáveis que quando são imobilizadas via ligação covalente multipontual (PALOMO *et al.*, 2012).

Com isso a preparação com CNBr foi realizada de forma que não favorecesse uma intensa ligação covalente multipontual (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). No entanto, o efeito

da imobilização de Lecitase em octil-agarose não parece tão positivo como para outras lipases, apenas a pH 5, a preparação de octil é claramente mais estável do que a preparação covalente.

A aminação aumentou as meias-vidas em octil-Lecitase (por um fator de 3 a 4 vezes em pHs 7 e 9, e por 1,5 a pH 5), ao passo que a aminação do CNBr-Lecitase não teve nenhum efeito sobre a estabilidade da enzima (por exemplo, pH 7 e 5) ou esse efeito foi ligeiramente negativo (por exemplo, pH 9).

A modificação com TNBS apresentou um efeito muito negativo sobre estabilidade da enzima utilizando o octil-Lecitase, principalmente, a pH 5 (quase um fator de 10 vezes menor). No entanto, a preparação covalente após a modificação com TNBS retirou a estabilidade a pH 5, este tratamento diminuiu por um fator de 2 vezes a pH 7, enquanto a pH 9 foi aumentado por um fator de 12 vezes.

O tratamento com glutaraldeído também produziu resultados mistos sobre a estabilidade da enzima. Octil - Lecitase aumentou a estabilidade por um fator de 15 vezes a pH 9 e por um fator de 3 vezes a pH 7, mas reduziu a estabilidade em 2 vezes a pH 5. Esse efeito de glutaraldeído sobre a estabilidade da enzima pode ser atribuído a uma reticulação intramolecular da enzima.

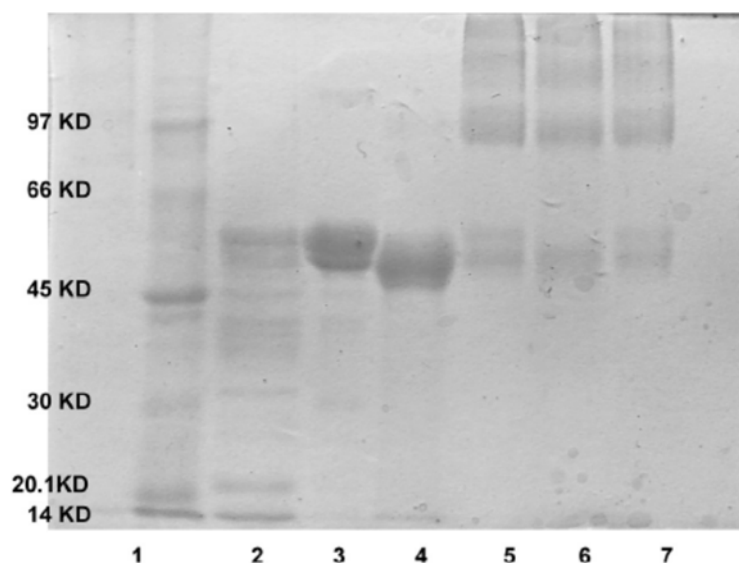
Para verificarmos se pelo menos há alguma reticulação intermolecular, a preparação foi submetida a um SDS-PAGE (**Figura 8.7**), que revelou muitos agregados (bandas proteicas com um peso molecular aparente mais elevada), o que confirma que, pelo menos, muitas moléculas foram intermolecularmente reticuladas covalentemente.

Talvez o efeito negativo da hidrofobização da cadeia Lys (já visualizados após a modificação de TNBS) não poderia ser revertido pelos efeitos positivos da reticulação, e pode ser que muitas ligações cruzadas intermoleculares não tenham sido formadas (a modificação foi muito rápida, de apenas 30 min antes da redução). Usando a preparação de CNBr, a estabilidade não foi alterada pelo tratamento com glutaraldeído a um pH de 9, que diminuíram por um fator de 2 vezes a pH 7, e um aumentou por uma fator de duas vezes a um pH de 5.

A modificação da enzima aminada com TNBS também produziu efeitos diversos. Usando octil-Lecitase aminada, a estabilidade da enzima é reduzida para valores semelhantes aos do TNBS-octil-Lecitase, em todos os valores de pH. No entanto, usando a preparação com CNBr, a estabilidade da enzima aminada aumentou após modificação com TNBS (um fator de 4 a 5 vezes a pH 7 e 5,8 vezes a pH 9), deixando esta enzima duplamente modificada como uma preparação mais estável do que o a enzima não modificada. Isto ocorreu apesar da

modificação ter causado efeito positivo somente quando utilizando a enzima nativa em pH 9. O incremento de moléculas de TNBS incorporadas na enzima, quando utilizando a enzima aminada, pode alterar completamente as interações na superfície da enzima.

Figura 8.7 - A análise de SDS-PAGE de diferentes preparações de octil-Lecitase. Experimentos foram realizados como descrito na seção 2. Linha 1: marcadores moleculares, linha 2: suspensão Lecitase comercial, linha 3: octil-Lecitase, linha 4: aminado-octil-Lecitase, linha 5: glutaraldeído-octil-Lecitase, linha 6: aminado octil-Lecitase tratadas com glutaraldeído, linha 7: glutaraldeído-Lecitase tratada com etilenodiamina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando a modificação foi realizada com o glutaraldeído, para a preparação octil-Lecitase aminada, ocorreu o aumento na estabilidade em um fator de 2,5 vezes em pH 9 e não se observou efeito significativo em pH 5 e 7. E isso ocorreu apesar de existir uma intensa reticulação intermolecular (ver **Figura 8.7**). Curiosamente, esta figura mostra que a enzima apenas aminada tem uma mobilidade eletroforética maior do que a enzima não modificada.

Considerando-se que outras enzimas aminadas não demonstraram este comportamento (BARBOSA *et al.*, 2012; GALVIS *et al.*, 2012), esta mobilidade mais elevada poderia estar associada a alguma reticulação intermolecular que evita o desdobramento completo da molécula de enzima (por causa da carbodiimida). No entanto, é difícil garantir isso, mesmo considerando os efeitos estabilizadores encontrados em alguns casos de tratamento por aminação. Na preparação de CNBr Lecitase aminada, ocorreu aumento na estabilidade depois de tratamento com glutaraldeído por um fator de 2 vezes a pH 7, por 6 vezes a pH 5 e de apenas 0,5 vezes a um pH 9.

A aaminação de octil-Lecitase modificada com TNBS, permitiu recuperar, parcialmente, os valores de estabilidade em todos os valores de pH, mas não foi suficiente para eliminar totalmente o efeito negativo do TNBS. A aaminação da preparação de octil-Lecitase com glutaraldeído é positiva a pH 5 (com um fator de 2,5 vezes), e pH 7 (1,8 vezes), e é negativa, a pH 9 (por duas vezes).

Usando CNBr Lecitase, a aaminação da enzima modificada com TNBS produziu uma ligeira estabilização a um pH 7, mas a um pH 5 a estabilidade diminuiu por um fator de quase 2 vezes e também eliminou todos os efeitos positivos da modificação com TNBS em pH 9, de fato, a preparação final é semelhante em termos de estabilidade à preparação não modificada.

Assim, como na atividade, os efeitos da modificação química sobre a estabilidade da enzima dependerá da estratégia de imobilização utilizada e das modificações anteriores realizadas, e não é possível dar qualquer regra geral. Mesmo a reticulação com glutaraldeído nem sempre tem um efeito positivo sobre a estabilidade da enzima.

O glutaraldeído, causou uma reticulação intermolecular, contudo uma reticulação intramolecular não pode ser descartada. Apresentou-se apenas um efeito positivo moderado sobre a estabilidade da enzima em várias condições de inativação (sem fatores de estabilização maiores que 10 vezes), e mesmo em certos casos, o efeito desta modificação foi considerado negativo.

8.4.6 Especificidade das diferentes preparações

A modificação química das enzimas provou ser uma ferramenta para alterar a especificidade da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012). Assim, foi avaliada a atividade das diferentes preparações de enzimas contra alguns substratos a **Tabela 8.3** mostra a atividade das diferentes preparações contra *R* mandelato de metilo e fenilacetato de metilo.

O primeiro ponto a ser observado é que as duas preparações imobilizadas já se mostraram muito diferentes. Enquanto octil-Lecitase é muito mais ativa versus pNPB (ver **Tabela 8**), CNBr Lecitase tem 5 (versus fenilacetato de metilo) e 8 vezes mais atividade que a preparação octil (versus *R* mandelato de metilo). A pH 7 e 8,5, a preparação de CNBr apresentou quase a mesma atividade, enquanto que a pH 5, a atividade diminuiu cerca de 6 vezes frente a mandelato de metilo e apenas cerca de 10% frente a fenilacetato de metilo.

Octil-Lecitase tem claramente mais atividade a pH 7 do que a pH 8,5 (a atividade diminui em torno de 20-30%) e a pH 5 (atividade de diminuição de 60%), para ambos os substratos. Esta curva de pH/atividade é completamente diferente àquela encontrada usando pNPB (**Figura 8.3**).

As fortes mudanças na especificidade da lipase e a influência das variáveis experimentais das lipases após imobilização já foram descritos em muitos trabalhos (MATEO *et al.*, 2007). Assim, esperava-se que os biocatalisadores fossem diferentes. No entanto as diferenças são muito maiores do que as normalmente encontradas. Assim, estas diferenças foram consideradas para se analisar o efeito das modificações químicas .

Tabela 8.3 - Atividade de diferentes preparações Lecitase contra diferentes substratos. Os detalhes experimentais podem ser encontrados na Seção 2 RM, *R* metil mandelato; MPA, fenilacetato de metilo. XXX significa atividade muito baixa para ser determinada. A atividade é determinada em U/mg .

BIOCATALISADOR/ pH/ substrato (R/S razão entre atividade)	Modificação química							
	Não modificada	EDA	TNBS	GLUTA	EDA-TNBS	EDA-GLUTA	TNBS-EDA	GLUTA-EDA
Octyl/pH5/R-MM (V_R/V_S)	7.5 ± 0.5 (0.82 ± 0.1)	1.0 ± 0.09 (0.72 ± 0.1)	1.3 ± 0.1 (0.77 ± 0.1)	18.4 ± 1 (4.6 ± 0.4)	2 ± 0.1 (0.38 ± 0.07)	4.8 ± 0.03 (0.74 ± 0.1)	2.2 ± 0.15 (0.77 ± 0.1)	2 ± 0.01 (0.61 ± 0.1)
Octyl/pH7/R-MM (V_R/V_S)	19.7 ± 2 (0.73 ± 0.1)	12.7 ± 1 (0.4 ± 0.07)	2.5 ± 0.1 (0.72 ± 0.1)	3.2 ± 0.2 (1.1 ± 0.1)	3.7 ± 0.1 (0.38 ± 0.05)	23 ± 1 (0.48 ± 0.07)	2.7 ± 0.2 (0.83 ± 0.1)	24 ± 2 (0.71 ± 0.1)
Octyl/pH 8.5/R-MM (V_R/V_S)	13.7 ± 2 (0.68 ± 0.1)	12.1 ± 0.9 (0.37 ± 0.05)	4.8 ± 0.3 (1.2 ± 0.2)	8.7 ± 0.3 (1.3 ± 0.1)	8.6 ± 0.4 (0.52 ± 0.7)	11.6 ± 1 (0.5 ± 0.5)	8.2 ± 1 (0.76 ± 0.15)	7 ± 1 (0.49 ± 0.06)
Octyl/pH5/MPA	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.78 ± 0.05	0.21 ± 0.02	0.7 ± 0.1	0.96 ± 0.07	0.69 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Octyl/pH7/MPA	0.4 ± 0.05	XXX	0.63 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.99 ± 0.1	0.65 ± 0.04	0.57 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Octyl/pH 8.5/MPA	0.22 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.52 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.64 ± 0.05	0.63 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02
CNBr/pH 5/R-MM (V_R/V_S)	24 ± 3 (0.64 ± 0.1)	22.3 ± 1 (0.99 ± 0.1)	10.6 ± 0.5 (0.98 ± 0.1)	36.2 ± 2 (0.7 ± 0.1)	2.1 ± 0.2 (0.38 ± 0.05)	4.8 ± 0.3 (0.41 ± 0.05)	2.2 ± 0.1 (0.52 ± 0.1)	21.2 ± 0.9 (0.55 ± 0.1)
CNBr/pH 7/R-MM (V_R/V_S)	160 ± 10 (0.93 ± 0.1)	22.3 ± 1 (1 ± 0.1)	142.4 ± 12 (0.96 ± 0.1)	125 ± 10 (0.83 ± 0.15)	23.6 ± 2 (0.38 ± 0.04)	17.8 ± 1.5 (0.71 ± 0.5)	25.6 ± 2 (1.3 ± 0.15)	10.9 ± 1 (1.4 ± 0.1)
CNBr/pH 8.5/R-MM (V_R/V_S)	143 ± 10 (1.22 ± 0.15)	19 ± 2 (1.2 ± 0.1)	542 ± 30 (0.96 ± 0.1)	126 ± 13 (0.76 ± 0.1)	26.2 ± 2 (0.52 ± 0.1)	15.1 ± 1.5 (0.9 ± 0.15)	21.5 ± 2 (1.15 ± 0.15)	101.8 ± 3 (1.2 ± 0.1)
CNBr/pH 5/MPA	1.7 ± 0.2	XXX	0.77 ± 0.05	1.83 ± 0.1	1.8 ± 0.2	0.27 ± 0.02	1.51 ± 0.1	1 ± 0.05
CNBr/pH 7/MPA	2.2 ± 0.1	XXX	0.75 ± 0.03	0.62 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.51 ± 0.03	1.43 ± 0.1	1.8 ± 0.08
CNBr/pH 8.5/MPA	2.0 ± 0.15	XXX	0.77 ± 0.04	0.71 ± 0.1	0.71 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.62 ± 0.04	1.6 ± 0.03

Fonte: Elaborada pelo autor.

A aaminação da preparação CNBr-Lecitase produziu uma forte diminuição da atividade da enzima a pH 7 e 8,5 versus *R* mandelato de metilo (para 15%), a pH 5, o efeito também é negativo, mas mais limitado (50%). Isto é completamente diferente para o resultado utilizando pNPB, em que o efeito mais negativo era a pH 5 e a pH alcalino, o efeito era ainda positivo.

Usando fenilacetato de metilo, a atividade não foi detectada nas condições experimentais, a qualquer valor de pH (inferior a 1% de hidrólise após 24 h de reação). A aaminação do octil-Lecitase aumentou a atividade contra mandelato de metilo em 30% a pH 5 e diminui a pH 7 (em 30%) e pH 8,5 (por apenas 10%). Utilizando como substrato fenilacetato de metilo, a atividade a pH 7 foi tão baixa que não foi possível detectá-la, mas a atividade aumentou em comparação com a enzima não modificada a pH 5 (por um fator de 50%) e ocorreu uma diminuição da atividade a pH 8,5 (em torno de 10%). Novamente, usando pNPB, os resultados foram muito diferentes, com incrementos de atividades em todas as condições.

A Modificação do CNBr-Lecitase com TNBS quase não teve nenhum efeito sobre a atividade enzimática contra metil mandelato a pH 7, enquanto que em pH 5 a atividade diminuiu mais de um fator de 2 vezes e em pH 8,5 a atividade é reduzida em cerca de 30%. Usando fenilacetato de metilo, a pH 7, houve nenhum efeito significativo, enquanto que a pH 8,5 e pH 5 a atividade diminuiu para cerca de 35/45%.

A modificação com TNBS tem um efeito ainda mais negativo em octil-Lecitase sobre a atividade contra o mandelato de metilo, a diminuição da atividade em pH entre 7 e 5 foi por um fator de 6 a 8 vezes, enquanto a pH 8,5 este decréscimo é de 40%. No entanto, usando fenilacetato de metilo, um aumento claro de atividade é observado nos três valores de pH, com um ótimo a pH 5 (aqui o incremento da atividade é por 5 vezes). Mais uma vez, os resultados foram muito diferentes usando pNPB.

A modificação de CNBr-Lecitase com glutaraldeído não produziu um aumento muito relevante, ou uma diminuição na atividade (não mais do que 50%), dependendo do pH e do substrato. Usando a preparação octil-Lecitase, a pH 5 ocorreu diminuição na atividade para 45% utilizando mandelato de metilo, enquanto um aumento de 40%, utilizando-fenilacetato de metilo. A pH 8,5, a atividade para ambos os substratos é reduzida para 60-70%.

A aaminação de CNBr Lecitase modificada com TNBS produziu uma diminuição muito significativa da atividade do biocatalisador contra mandelato de metilo, mas

ligeiramente menor do que a aaminação da enzima imobilizada não modificada com pH 7 e 8,5 enquanto que o pH 5 a atividade diminuiu para 10%. Usando fenilacetato de metilo como substrato, a um pH de 5 a atividade da enzima modificada com TNBS aumentou após a aaminação para se tornar semelhante à da enzima não modificado, enquanto que a pH 7 e 8,5, a atividade diminuiu.

Usando a preparação octil modificada com TNBS, aaminação aumentou a atividade contra mandelato de metilo em 1,7 vezes a pH 5 e 8,5, e apenas por um 10% a um pH de 7, utilizando a atividade frente metil fenilacetato ocorreu ligeira diminuição em toda a gama de valores de pH estudados, com um decréscimo mais elevado a um pH de 8,5 (em 30%).

A aaminação de CNBr-Lecitase modificada com glutaraldeído produziu uma ligeira diminuição da atividade contra ambos os substratos. A situação era diferente usando glutaraldeído em octil-Lecitase, quando o uso de metil mandelato promoveu um incremento de 30% da atividade enzimática detectada em pH 7, enquanto a atividade diminuiu em pH 5 e 8,5. No entanto, o uso de fenilacetato de metilo, a atividade aumentou por um fator de 2 a 2,3 vezes após a aaminação da enzima modificada.

A modificação com TNBS de CNBr-Lecitase aminado melhorou ligeiramente a atividade contra o mandelato de metilo a pH 7 e 8,5, e tem um efeito muito negativo no pH 5 (por um fator de 6 vezes). Usando fenilacetato de metilo, foi possível detectar novamente a atividade da enzima, e a pH 5 é ainda mais elevada do que a da enzima não modificada.

Octil-Lecitase aminada após modificação com TNBS diminuiu a atividade contra o mandelato de metilo, principalmente, a pH 5 e 7, no entanto, a atividade contra o fenilacetato de metilo aumentou, tornando-se a preparação com octil mais ativa contra este composto, a pH 7 e 8,5 (a pH 5 é igualmente com apenas o biocatalisador modificado com TNBS na segunda posição). A modificação da enzima imobiliza com TNBS proporcionou boa hiperativação contra este substrato.

O tratamento de CNBr-Lecitase aminada com glutaraldeído tem um efeito negativo sobre a atividade da enzima contra mandelato de metilo, para 35% no caso mais drástico (pH 5). Usando mandelato de metilo, a atividade foi detectada novamente, mas com valores mais baixos do que 25% da preparação não modificada.

Usando octil-Lecitase aminada, a situação é bem diferente. A atividade aumenta utilizando mandelato de metilo a pH 7 (por um 80%) e diminuiu a pH 5 (um 50%), enquanto que a pH 8,5, não houve alteração significativa. As alterações mais relevantes são na atividade

contra o éster do ácido fenilacético, agora a atividade é detectável em todas as condições de pHs e o bicatalisador ainda é mais ativo na preparação de octil a pH 5.

8.4.7 *Enantio-especificidade das diferentes preparações*

A **Tabela 8.3** também mostra as razões VR / VS. Como as reações não são de ordem 1, não está diretamente associada à enantioespecificidade, mas ainda é válido para detectar mudanças na atividade da enzima contra diferentes enantioisômeros.

A preparação CNBr-Lecitase tem uma atividade muito semelhante, usando os dois isômeros a um pH7. No, a um pH 5, o isômero *S* foi preferido (0,65) e a pH de 8,5, o isômero *R* foi preferido (1,2). A preparação octil hidrolisou mais rápido o isômero *S* nos valores de pH 5, mas com uma má relação VR / VS (melhores resultados foi de 0,68 a pH 8,5). Assim, ambas as preparações de Lecitase foram quase não enantiosseletiva.

Nestas condições desfavoráveis, a modificação química mostra que algumas melhorias poderiam ser alcançadas mesmo quando usamos uma bateria de modificações. A preparação CNBr-Lecitase melhorou a especificidade para o isômero *S* após aminação e outra modificação com TNBS (0,38) a um pH7, ao passo que a aminação dos derivados modificados com TNBS e glutaraldeído produziram alguma preferência significativa para o isômero *R* (1,3/1,4).

A pH 5, o resultado mais relevante é uma proporção de 4,7 para a enzima modificada com glutaraldeído e de 0,38 para a enzima aminada e modificada com TNBS. Este último teve uma taxa mais significativa a pH 8,5, de 0,5 (enquanto que a enzima não modificada preferiu o isômero *R*). Usando o octil-Lecitase, apenas a enzima aminada a pH 7 (0,4 de razão) e a pH 8,5 (razão de 0,38) melhorou a preferência para com o isômero *S*. A preparação com octil teve apenas uma preferência para o isômero *R*, que é a enzima modificada com TNBS (de 1,2).

8.5 Conclusão

Os resultados apresentados nos experimentos descritos e aludidos até aqui nos mostram que as propriedades de Lecitase podem ser facilmente alteradas através da imobilização ou modificação química. A atividade, especificidade ou estabilidade, mesmo o efeito dos detergentes sobre a atividade da enzima pode ser modulada por estas técnicas. No

entanto, demonstrou-se que a tentativa de estabelecer regras gerais para racionalizar os efeitos é muito complicada, com o conhecimento disponível, o efeito de uma modificação química é muito diferente, dependendo da preparação imobilizada utilizada.

Além disso, o efeito das condições experimentais sobre as características da enzima também são alteradas por meio de imobilização e modificação química: uma alteração nas condições experimentais que têm um efeito positivo sobre a função da enzima em um biocatalisador pode ter um efeito negativo usando outra preparação imobilizada com a mesma modificação.

Assim, imobilização e modificação química parecem ser uma estratégia poderosa para melhorar as propriedades da Lecitase, apesar de atualmente esta ser baseada em um julgamento de uma estratégia-erro, onde os resultados finais são muito improváveis, podem ser positivos se a bateria de biocatalisadores é grande o suficiente (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Capítulo 9

*Recobrimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos visando
à melhoria da sua capacidade catalítica*

Os dados apresentados neste capítulo estão publicados em:

SANTOS, JOSE C. S. DOS; GARCIA-GALAN, CRISTINA; RODRIGUES, R.C.; SANT'ANA, H.B.; LUCIANA R.B. GONÇALVES; FERNANDEZ-LAFUENTE, ROBERTO. Improving the catalytic properties of immobilized lecitase via physical coating with ionic polymers. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 60, p. 1-8, 2014.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.03.001>

9.1 Resumo

Lecitase Ultra foi imobilizada em brometo de cianogênio agarose (por meio de ligação covalente) e em octil agarose (via adsorção física no suporte hidrofóbico por ativação interfacial). Ambas as preparações imobilizadas foram incubadas em dextrano sulfato (DS) ou soluções de polietilenimina (PEI) para o revestimento da superfície da enzima. Em seguida, a atividade, contra diferentes substratos e sob diferentes condições experimentais, foi avaliada. O revestimento com PEI, em geral, produziu um aumento significativo na atividade enzimática, em alguns casos até por mais de um fator de 30 vezes (utilizando o octil-Lecitase a pH5 na hidrólise de acetato de fenila). Ao contrário, o revestimento com DS produziu, em muitos casos, efeitos negativos sobre a atividade da enzima. A taxa de inibição irreversível da preparação covalente usando dietil-p-nitrofenil-fosfato não aumentou após o revestimento com PEI, sugerindo que o aumento da atividade de Lecitase não é uma consequência da estabilização da forma aberta de enzima. Além disso, o revestimento aumentou significativamente a estabilidade da Lecitase imobilizada, por exemplo, utilizando DS e a preparação covalente (CNBr-Lecitase), a meia-vida foi aumentada por um fator de 30 vezes na presença de 30% acetonitrilo. O efeito de estabilização não foi observado em todos os casos, ocorrendo inclusive, em certos casos, certa desestabilização (por exemplo, octil-Lecitase-DS, a pH7). Assim, os efeitos do revestimento com polímeros iônicos dependem fortemente do substrato, das condições experimentais e da técnica de imobilização utilizada.

Palavras-chave: Lecitase Ultra. Ativação interfacial. Hiperativação enzimática. Estabilização de enzima. Dextrano sulfato e polietilenimina.

9.2 Introdução

Lecitase Ultra é uma fosfolipase quimera artificial A1, desenvolvida principalmente para processos de degomagem (HAVN *et al.*, 2006), embora as fosfolipases A1 tenham diferentes usos na indústria (HAVN *et al.*, 2006; 2006; YANG *et al.*, 2006; NA *et al.*, 1990; DEVOS *et al.*, 2006 e YAMAMOTO *et al.*, 2006). Esta enzima tem sido obtida a partir da fusão dos genes de lipase de *Thermomyces lanuginosus*, como forma de obter uma boa estabilidade, e da fosfolipase de *Fusarium oxysporum*, onde obtemos uma fosfolipase ativada (DE MARIA, *et al.*, 2007).

Em alguns aspectos, esta enzima se comporta como uma lipase padrão, com a capacidade de se adsorver nas superfícies hidrofóbicas em força iônica baixa, como exemplo os suportes hidrofóbicos (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007), assim como também pode apresentar uma ampla especificidade, tornando-se uma de suas propriedades. (YANG *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2013; LIU N *et al.*, 2012a; LIU *et al.*, 2012b; LIU *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011).

As propriedades das lipases, seletividade e especificidade, podem ser moduladas via preparação do biocatalisador (RODRIGUES, *et al.*, 2013). Por exemplo, durante a imobilização da enzima, suas propriedades são muito alteradas. Devido ao mecanismo de ativação interfacial (MILED, *et al.*, 2001; DEREWENDA, *et al.*, 1994;), o seu centro ativo é muito flexível, envolvendo as áreas específicas da enzima durante a imobilização, a sua atividade, estabilidade e mesmo especificidade e seletividade, pode ser grandemente alterada (FERNANDEZ-LORENTE, *et al.*, 2007; FERNANDEZ-LORENTE, *et al.*, 2008; CABRERA, *et al.*, 2008). Isto tem sido explicado pela alteração do mecanismo de fechamento/abertura das lipases, ou apenas através da distorção do centro ativo flexível (RODRIGUES, *et al.*, 2013).

A modificação química é também uma poderosa ferramenta para melhorar as propriedades das lipases, com alguns relatos na literatura mostrando o potencial dessa estratégia (BARBOSA, *et al.*, 2012). A modificação química pode ser facilmente realizada em enzimas já imobilizadas, tendo a vantagem de ser em fase sólida, como também a possibilidade de melhorar a sua estabilidade (RODRIGUES, *et al.*, 2011). A Lecitase é uma enzima reportada na literatura como exemplo, podendo-se melhorar as propriedades catalíticas através de modificações químicas. (GARCIA-GALAN, *et al.*, 2014).

Outra possibilidade menos explorada para alterar o comportamento de lipases imobilizadas pode ser o revestimento da superfície da enzima utilizando polímeros iônicos, como polietilenimina (PEI) ou dextrano sulfato (DS) (CABRERA, *et al.*, 2010; CABRERA, *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-LORENTE, *et al.*, 2012). O revestimento por meio de troca iônica requer apenas que a proteína possua áreas suficientemente ricas em íons com cargas opostas a do polímero que se deseja utilizar, de maneira a permitir certa troca iônica multipontual entre o polímero e a enzima. De fato o revestimento com ambos os polímeros (PEI e DS) é capaz de absorver uma elevada percentagem de proteínas (próximo de 90%) em pH 7 (MATEO, *et al.*, 2000; FUENTES, *et al.*, 2004).

Além disso, este revestimento físico rápido não envolve qualquer modificação química da enzima. Na preparação do biocatalisador, juntamente com a ativação do suporte, estes polímeros têm sido empregados para o tratamento de enzimas livres com diferentes fins, tais como a estabilização de estruturas multiméricas ou impedindo interações com superfícies. (BOLIVAR, *et al.*, 2009; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; GARCIA-GALAN, *et al.*, 2013). Em certos casos, a estabilização da enzima é conseguida apenas por efeitos positivos das interações enzima-PEI (BRYJAK, *et al.*, 1995; ANDERSSON, *et al.*, 1999).

A interação do polímero com a proteína pode promover efeitos diferentes, que podem conduzir a uma afinação final das propriedades enzimáticas. Por exemplo, pode ser possível que ocorra toda a hidrofilição da superfície da enzima assim alterando o equilíbrio de fechamento/abertura. Além disso, estes polímeros podem gerar alguns impedimentos para os movimentos da tampa, evitando a abertura completa ou fecho da tampa.

É provável que a interação multipontual do polímero (apesar de ser uma molécula flexível) com a superfície da enzima produza alguma distorção da estrutura da enzima. Mais ainda, estes polímeros têm sido descritos como se fossem capazes de gerar um microambiente hidrofílico em torno das moléculas da enzima imobilizada, o que também pode afetar o desempenho da enzima sob condições diferentes (por exemplo, favorecendo a partição de solvente, oxigênio, etc) (WILSON, *et al.*, 2004; FERNANDEZ-LAFUENTE, *et al.*, 1999; MATEO, *et al.*, 2006).

Os efeitos do polímero podem ser diferentes dependendo da sua natureza catiônica ou aniônica, por causa da área envolvida nas interações polímero/enzima. Além disso, o protocolo de imobilização pode alterar o efeito do polímero, uma vez que diferentes áreas da enzima serão expostas a interação. No entanto, isto não foi até agora aprofundado.

Assim, neste capítulo, será mostrada as mudanças na atividade, especificidade e estabilidade de Lecitase Ultra, após o revestimento com dois polímeros diferentes, DS ou PEI. De maneira a verificar o efeito do protocolo de imobilização na modulação das características da enzima através do revestimento com um polímero, utilizou-se uma estratégia de imobilização onde a forma aberta da enzima é estabilizada - imobilização reversível através da ativação interfacial em octil agarose (FERNÁNDEZ-LORENTE, *et al.*, 2007; FERNANDEZ-LAFUENTE, *et al.*, 1998), bem como uma estratégia na qual há formação de uma ligação covalente - usando brometo de cianogênio agarose sob condições suaves para reduzir o número de ligações enzima/suporte (MATEO, *et al.*, 2005; SCHNAPP, *et al.*, 1976).

9.3 Materiais e Métodos

9.3.1 Materiais

A Lecitase foi obtida a partir da empresa **Novozymes** (Espanha). Octil-agarose e brometo de cianogênio reticulado 4% (CNBr) foram da empresa **GE Healthcare**. **Polietilenoimina** (Mn 10000, Mw 25000), dextrano sulfato (9000, 20000 Av. wt) p-nitrofenil butirato (p-NPB), *R* e *S* mandelato de metilo, hexanoato de etilo, dietil p-nitrofenilfosfato (pNPP D-) e fenilacetato de metila foram obtidos da empresa **Sigma Chemical Co.** (St. Louis, MO, EUA). Glutaraldeído (25%, v/v estabilizado em etanol) foi da empresa **Fluka**. Todos os demais reagentes e solventes eram de grau analítico.

9.3.2 Determinação da atividade enzimática

Este ensaio foi realizado através da medição do aumento da absorvância a 348nm produzidos pela liberação do p-nitrofenol durante hidrólise de p-nitrofenilbutirato (p - NPB) 0,4mM em fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 25 °C (sob estas condições $\varepsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para iniciar a reação, 50-100µl de solução de lipase, ou de suspensão (enzima imobilizada + solução tampão), foram adicionadas a 2,55mL da solução de substrato. Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de p-NPB por minuto sob as condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, *et al.*, 1976) e albumina de soro bovino foi utilizada como referência.

Na determinação dos efeitos do valor do pH sobre a atividade da enzima, o protocolo seguido foi semelhante, mas o tampão utilizado foi alterado de acordo com o valor de pH: acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 6-8 e borato de sódio a pH 9 e pH 10 a 25 °C, todas as preparações eram inteiramente estáveis após incubação durante várias horas em qualquer um destes valores de pH.

9.3.3 Imobilização de Lecitase em octil agarose

A Lecitase foi imobilizada em octil-agarose em baixa força iônica (FERNÁNDEZ-LORENTE, *et al.*, 2007 e SCHNAPP, *et al.*, 1976). 2,8 ml de extrato comercial (16 mg de proteína/mL, com uma atividade pNPB de 5,6 /mg de proteína) foram diluídos em 67,5 mL de fosfato de sódio 5 mM a pH 7, e em seguida, foram adicionadas 15g de octil agarose úmida. Atividade do sobrenadante e suspensão foram seguidas usando pNPB. Depois, da imobilização, a suspensão foi filtrada e a lipase suportada foi lavada várias vezes com água destilada. O rendimento de imobilização foi superior a 90%.

9.3.4 Imobilização de Lecitase em CNBr agarose

Um volume de 2,8 mL de Lecitase comercial foi diluída em 67,5 ml de fosfato de sódio 5 mM contendo 0,05% (m/v) de dodecil sulfato de sódio a pH 7, a 4°C. Logo em seguida, adicionaram-se 15 g de CNBr. Atividade do sobrenadante e suspensão foi seguida usando pNPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte com etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Finalmente, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada abundante. O rendimento de imobilização foi superior a 90%.

9.3.5 Revestimento de imobilizada por Lecitase polímero iônico

Uma massa de 10g de Lecitase imobilizada foi adicionada a 100 mL de PEI a pH 7 ou a pH 5 em soluções de DS na concentração desejada de polímero. A atividade durante a incubação foi seguida pelo protocolo para determinação da atividade frente ao p-NPB descrito anteriormente.

9.3.6 Inativação térmica de diferentes preparações de Lecitase imobilizada

Para verificar a estabilidade dos derivados de enzimas, 1g de enzima imobilizada foi suspenso em 5 mL de 10 mM de acetato de sódio a pH 5, em fosfato de sódio pH 7, ou carbonato de sódio a um pH de 9, em diferentes temperaturas. Periodicamente, as amostras foram retiradas e a atividade foi medida usando p-NPB. As meias-vidas foram calculadas através dos cursos de inativação observados.

9.3.7 Inativação de diferentes preparações de Lecitase na presença de co-solvente orgânico

Preparações enzimáticas foram incubadas em misturas de 30% acetonitrilo em 100mM Tris-HCl 7 e 25°C para prosseguir com a inativação. Periodicamente, as amostras foram retiradas e a atividade foi medida usando p-NPB. As meias-vidas foram calculadas a partir dos cursos de inativação observados. O acetonitrilo apresentado nas amostras não teve um efeito significativo sobre a atividade da enzima.

9.3.8 Hidrólise do hexanoato de etila

A atividade enzimática foi determinada através da utilização de hexanoato de etila; 200 mg das preparações imobilizadas foram adicionadas a 0,2 mL de 5 mM de substrato em tampão 100 mM contendo 50 % de CH₃CN. O tampão foi acetato de sódio a pH5, fosfato de sódio a pH 7, e carbonato de sódio a pH 8,5. Todos os experimentos foram realizados em a 25 °C, sob agitação contínua.

O grau de conversão foi analisado por RP - HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 centímetros). As amostras (20 µL) foram injetadas e efluídas a um fluxo de 1,0 mL / min, utilizando acetonitrilo, uma solução aquosa de acetato de amônio 10 mM (35:65 , v/v) e pH 2,8, como fase móvel, e detecção por UV foi efetuada a 208 nm. Ácido tem um tempo de retenção de 3 minutos, enquanto o éster tem um tempo de retenção de 12 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mol de ácido fenil acético por minuto sob as condições descritas acima. A atividade foi determinada por triplicado, com um máximo de conversão de 20-30%, e os dados são apresentados como valores médios.

9.3.9 Hidrólise do fenilacetato de metila

A atividade enzimática foi determinada usando o fenilacetato de metila como substrato. Para tal, 200 mg das preparações imobilizadas foram adicionadas a 0,2 mL de solução contendo 5 mM de substrato em tampão 100 mM e 50 % de CH₃CN. O tampão foi acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 7, e carbonato de sódio a pH 8,5. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C, sob agitação contínua. O grau de conversão foi analisado por RP - HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 centímetros).

Às amostras (20 µL) foram injetadas e eluídas a um fluxo de 1,0 mL / min, utilizando acetonitrila, uma solução aquosa de acetato de amônio 10 mM (35:65, v/v) e pH 2,8, como fase móvel, e detecção por UV foi efetuada a 230 nm. O ácido tem um tempo de retenção de 3 minutos, enquanto o éster tem um tempo de retenção de 12 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mol de ácido fenil acético por minuto sob as condições descritas acima. A atividade foi determinada em triplicata, com um máximo de conversão de 20-30 %, e os dados são apresentados como valores médios.

9.3.10 Hidrólise de R e S mandelato de metilo

A atividade enzimática também foi determinada usando R ou S mandelato de metila. 400 mg das preparações imobilizadas foram adicionadas a 2 ml de substrato (50 mM) em tampão (acetato de sódio 100 mM a pH 5, 100 mM de fosfato de sódio a pH 7 ou o carbonato de sódio 100 mM) a pH 9 e 25 °C, sob agitação contínua. O grau de conversão foi analisado por RP - HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com um detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm × 0,46 centímetros). Amostras (20 µL) foram injetadas e eluídas a um fluxo de 1,0 mL / min utilizando acetonitrila/10 mM de acetato de amônio (35:65, v/v) a pH 2,8 como fase móvel e detecção de UV foi realizada a 230 nm. O ácido tem um tempo de retenção de 2,5 minutos; enquanto o éster tem um tempo de retenção de 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática, assim foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido mandélico por minuto sob as condições descritas anteriormente. A atividade foi determinada em triplicata, com um máximo de conversão de 20-30%, e os dados são apresentados como valores médios.

9.3.11 Inativação irreversível de Lecitase imobilizada na presença de D-pNP

Diferentes preparações de lipase imobilizada (0,8 g) foram suspensas em 5 mL de solução tampão de fosfato de sódio 100 mM a pH 7 e 25 °C. Em seguida, d-p-NPP foi adicionado até uma concentração de 1mM. Amostras desta suspensão foram retiradas periodicamente, e suas atividades foram verificadas utilizando o ensaio p-NPB.

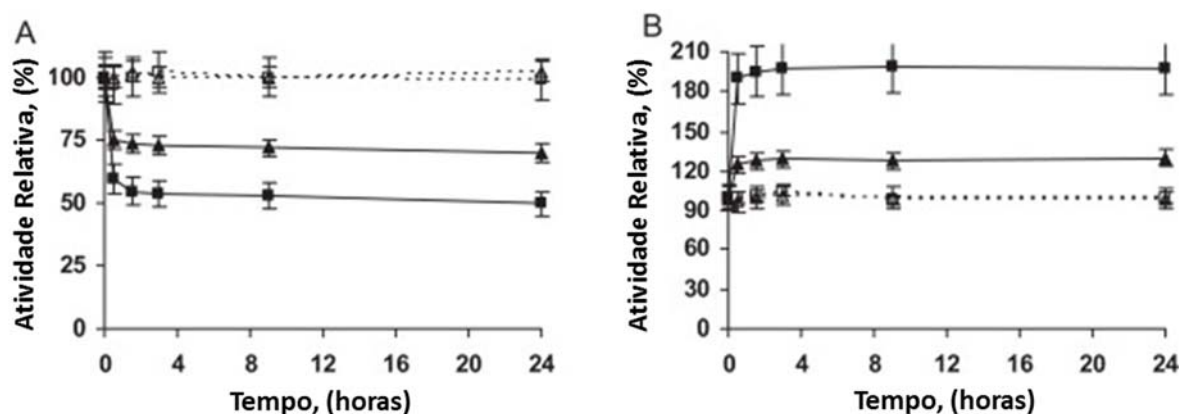
9.4 Resultados e discussões

9.4.1 Efeito do revestimento com DS e PEI na atividade de Lecitase Ultra imobilizada.

Em primeiro lugar, o efeito dos polímeros iônicos na atividade da enzima solúvel foi avaliada. Foram misturadas enzima livre e PEI, e ocorreu um incremento inicial de atividade da enzima (após 2h, a atividade aumentou em 200%), mas, posteriormente, a atividade da enzima diminuiu até valores próximos aos iniciais. Usando DS e enzima livre, a atividade permaneceu inalterada após 24 h. Embora não tenha sido percebido aumento na turbidez da solução (foi utilizado 0,05 mg de proteína/mL), a possibilidade de algum tipo de agregação de enzima, que pode mascarar os efeitos do revestimento do polímero, não pode ser descartada. Assim, nesse estudo, decidiu-se pela utilização de enzima imobilizada, em que a formação de agregados não é possível.

A **Figura 9.1** mostra o efeito sobre a atividade da enzima durante incubação de CNBr e octil-Lecitase em soluções contendo PEI ou DS, com 50 mg de polímero por g de suporte. A incubação com DS produziu uma diminuição da atividade rápida e significativa. Usando CNBr-Lecitase, após uma primeira queda rápida de cerca de 50%, a atividade foi estabilizada após 24h de incubação. Usando octil-Lecitase, a diminuição da atividade é de apenas cerca de 30%. A incubação com PEI produziu um efeito completamente diferente. A atividade de ambas as preparações de enzimas imobilizadas aumentou nos primeiros minutos. Com octil-Lecitase a atividade aumentou em 30%, enquanto com CNBr-Lecitase a atividade aumentou em mais do que duas vezes.

Figura 9.1 - Efeito sobre a atividade da enzima durante incubação com os polímeros iônicos com diferentes preparações de Lecitase imobilizadas. A quantidade de polímero foi de 50 mg /g de biocatalisador, e a incubação foi realizada a pH 7 (PEI de 25 kDa) ou de pH 5 (DS de 20 kDa) e 25°C. Outras condições são descritas nos métodos. Incubação com DS é mostrada no painel A, a incubação com PEI é mostrada no painel B. Quadrados: CNBr-Lecitase, Triângulos: Octil-Lecitase. Linha contínua: incubação com o polímero. A linha tracejada: referência na ausência de polímero.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A enzima imobilizada covalentemente foi mais sensível ao revestimento com os polímeros, tanto no efeito negativo com DS e no efeito positivo com PEI. Isto poderia ser explicado por várias razões. Primeiro, as regiões da proteína de exposição para a modificação podem ser diferente nas duas enzimas imobilizadas (o polímero é muito volumoso e não pode interagir com os domínios da proteína orientada para a superfície do suporte), e as possíveis alterações conformacionais provocadas pelos revestimentos podem ser diferentes. Em segundo lugar, a enzima imobilizada em octil-agarose já se encontra estabilizada na forma aberta, se os efeitos do polímero afetam a abertura/fechamento da enzima, este efeito poderia ser perdido.

O efeito diferente dos dois polímeros pode estar relacionado com a diferença das áreas da enzima envolvidas na modificação, as áreas mais catiônicas para DS e as áreas mais aniônicas para revestimentos de PEI que, aparentemente, apresentam um efeito completamente diferente da atividade da enzima. Em seguida, tentamos aperfeiçoar o revestimento com PEI de ambas as preparações.

9.4.2 Otimização do revestimento com PEI de Lecitase Ultra imobilizada

Dependendo das condições experimentais, é possível fazer com que uma molécula do polímero interaja com uma maior área possível da proteína, ou tentar maximizar o número de moléculas de polímero por enzima (MATEO, *et al.*, 2000). O tamanho, a quantidade de polímero, o revestimento, ou o valor de pH pode ser ferramentas para tentar alterar este parâmetro. A Tabela 8.1 mostra os resultados obtidos.

Tabela 9.1 - Efeito dos diferentes parâmetros sobre a atividade recuperada de diferentes preparações de Lecitase após a incubação em soluções de PEI. 100% correspondem à atividade da preparação de Lecitase indicada na ausência de PEI. O revestimento foi realizado a 25 °C durante 24h.

Biocatalisador	pH	Quantidade de PEI (mg/g biocatalisador)	Tamanho da PEI (KDa)	Atividade relativa(%)
CNBr	7	2	25	200 ± 12
	7	10	25	280 ± 10
	7	50	25	180 ± 13
	6	10	25	250 ± 10
	8	10	25	260 ± 15
	7	10	2	270 ± 13
	7	10	750	300 ± 20
Octil	7	2	25	135 ± 8
	7	10	25	150 ± 9
	7	50	25	120 ± 8
	6	10	25	120 ± 9
	8	10	25	150 ± 10
	7	10	2	150 ± 9
	7	10	750	140 ± 10

Fonte: Elaborada pelo autor.

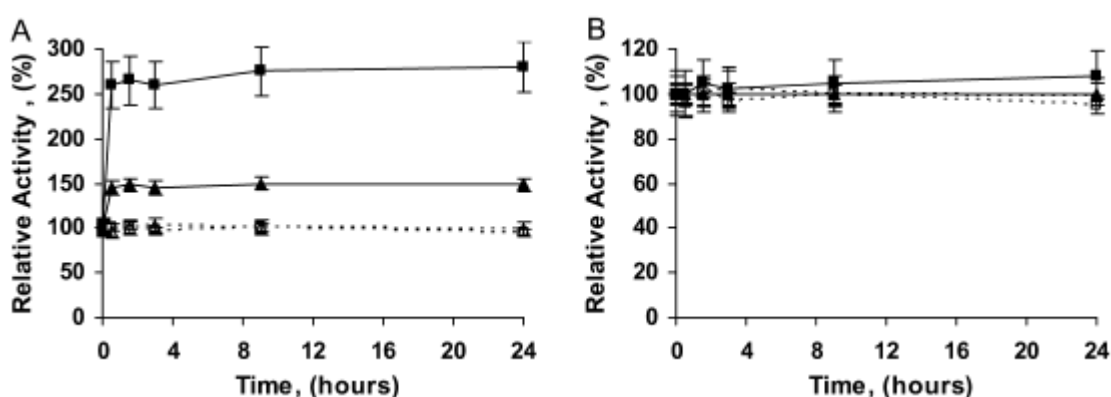
Para ambas as preparações imobilizadas, a quantidade de PEI mostrou ser o efeito mais significativo. Uma quantidade de 10 mg/g de biocatalisador mostrou uma hiperativação máxima principalmente para a preparação com CNBr (quase um fator 3 vezes por CNBr-Lecitase e cerca de 50% de octil-Lecitase). O valor de pH não apresentou um grande efeito no revestimento, mas usando CNBr-Lecitase percebeu-se que o pH 7 é um pouco mais favorável. O tamanho da molécula de PEI (Mw de 2000 Mw de 750.000 Da) exerce pouca influência ,

então decidiu-se utilizar a PEI com um Mw de 25.000 Da, semelhante ao tamanho do DS para fazer uma comparação mais justa.

9.4.3 Estudo sobre as causas dos efeitos do tratamento com PEI sobre a atividade da enzima

A **Figura 9.2** mostra o efeito da incubação de ambas às preparações de enzima em condições ótimas em solução de PEI, e na presença de cloreto de sódio (1M) para prevenir a interação da enzima com o polímero. Continuando a análise com a mesma figura (4.2), se faz evidente que a ativação da enzima só foi conseguida a baixa força iônica, para ambas as preparações. Assim, a PEI tem de ser adsorvida sobre a enzima para produzir o efeito ativador.

Figura 9.2 - Efeito sobre a atividade enzimática durante incubação com PEI, sob condições ótimas e diferentes preparações de Lecitase imobilizada (A) e em 1M de NaCl (B). O revestimento foi realizado utilizando PEI de 25 kDa, 25 °C, pH 7 e 10 mg / g de biocatalisador (painel A), no painel B NaCl 1 M foi adicionada para prevenir a troca iônica com polímero. Quadrados: CNBr-Lecitase; Triângulos: Octil-Lecitase. Linha contínua: incubação com o polímero; linha tracejada: referência na ausência de polímero.

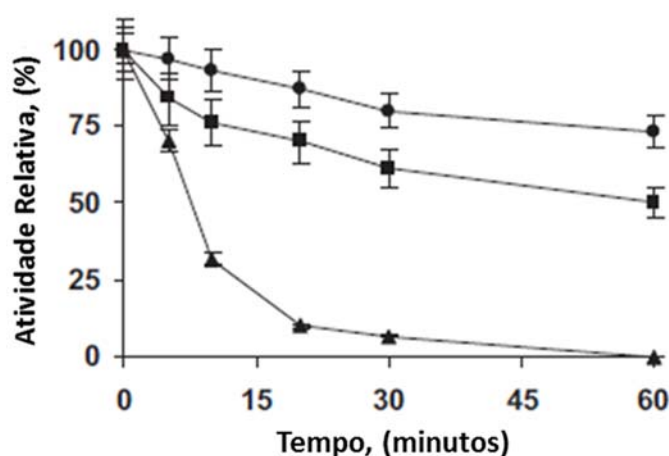


Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida, foi verificado se um dos efeitos do revestimento com PEI poderia ser a estabilização da forma aberta da CNBr-Lecitase (no caso do octil - Lecitase esta forma está já estabilizada). Para este objetivo, a preparação revestida e não revestida com o polímero, de CNBr-Lecitase foi incubada na presença de um inibidor irreversível de Serina-hidrolase. Este inibidor é capaz de reagir com o resíduo catalítico *Ser* da enzima, e é um modo simples para medir a exposição deste resíduo para o meio (CARRASCO-LÓPEZ, *et al.*, 2009 e FERNÁNDEZ-LORENTE, *et al.*, 2006).

A PEI é um polímero espiral aleatório que não deve produzir impedimento estereoquímico para a entrada do inibidor, uma vez que não produz problemas graves para a entrada do substrato p-NPB. A **Figura 9.3** nos mostra que a enzima revestida é inativada mais lentamente do que a enzima não revestida, o que sugere que a estabilização da forma aberta da enzima não é a explicação mais provável para a melhora da atividade.

Figura 9.3 - Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição são descritos na seção Métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir a atividade. 100% de atividade relativa em relação a atividade inicial de cada preparação. Quadrado: CNBr Lecitase; Triângulos: Octil-Lecitase; Círculos: CNBr Lecitase-PEI.



Fonte: Elaborada pelo autor.

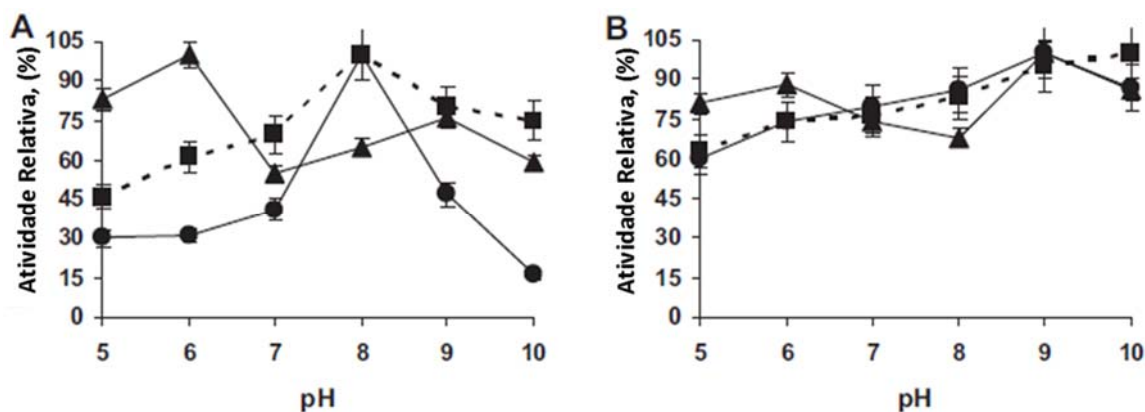
A preparação com octil, como era esperado para a estabilização da forma aberta da lipase, tornou-se inativada muito mais rapidamente do que a preparação com CNBr, e o revestimento da enzima não tem um efeito significativo sobre esta taxa inativação. Assim, o aumento da atividade produzida por incubação da Lecitase imobilizada com PEI parece estar relacionada com uma conformação da enzima mais adequada de CNBr-Lecitase revestida com PEI, e não a uma mudança muito significativa no equilíbrio conformacional da abertura/fechamento.

9.4.4 Caracterização dos derivados de Lecitase revestido com os polímeros

9.4.4.1 Efeito no perfil de atividade/pH

A **Figura 9.4** mostra o perfil de atividade em função do pH para as 6 preparações de Lecitase. Octil- e CNBr-Lecitase apresentam perfis muito diferentes. A preparação de octil tem a atividade máxima a pH mais elevado, o pH10 (utilização de um pH mais elevado é difícil devido à hidrólise química de pNPB), enquanto que a preparação covalente tem o máximo de atividade a pH 8. Usando CNBr-Lecitase, as mudanças causadas no perfil de atividade em função do pH pelo revestimento com os polímeros são muito mais relevantes.

Figura 9.4 - Efeito do pH sobre a atividade em pNPB de diferentes preparações de Lecitase. Atividade foi determinada como descrito na seção Métodos a 25 °C. 100% foi a atividade máxima para cada biocatalisador. Paineis A: CNBr-Lecitase, Paineis B: octil-Lecitase. Quadrados, linha tracejada: preparação não modificada; Triângulos, linha sólida: biocatalisador revestido com PEI; Círculos: biocatalisador revestido com DS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para octil - Lecitase revestida com PEI, o pH ideal foi de 9. A atividade aumentou em pH de 5-6, diminuindo depois disso até atingir um novo máximo de pH 9. Estes dois valores máximos observados com ambas as preparações revestidas com PEI pode ser devido à mudanças na intensidade da adsorção de PEI sobre a enzima.

Usando o DS para o revestimento da enzima, a preparação octil também possui a atividade máxima a um pH de 9, com uma queda na atividade a um pH de 10, enquanto que a preparação covalente tem o seu máximo com um pH 8, um máximo mais claro do que o uso de qualquer outra forma de preparação. Assim, o tipo de polímero e o protocolo de

imobilização afeta a forma final da curva atividade/pH de Lecitase Ultra, e o efeito é diferente utilizando a ligação covalente ou a enzima adsorvida (no primeiro caso, as alterações são muito mais evidentes).

9.3.4.2 Estabilidade sob diferentes condições

A **Tabela 9.2** apresenta o tempo de meia-vida dos 6 derivados, após inativação térmica a diferentes valores de pH. O revestimento da enzima pode ter qualquer tipo de efeito sobre sua estabilidade, principalmente na produção de alterações graves na atividade enzimática. Por exemplo, se a atividade aumenta pelo revestimento e este polímero move-se, devido às condições experimentais, o efeito hiperativante talvez seja perdido à temperatura drástica e produza uma “aparente” inativação da enzima.

Ainda de acordo com a **Tabela 9.2**, alguns efeitos de estabilização podem ser encontrados após o revestimento de enzimas, o que sugere que este efeito hiperativante não foi perdido por incubação sob tais condições. Mais uma vez, este depende da preparação imobilizada e do polímero utilizado.

Tabela 9.2 - A estabilidade térmica das diferentes preparações Lecitase em diferentes condições. As meias-vidas são dadas em horas. Outras especificações estão descritos em métodos.

Biocatalisador	pH5 (50°C)	pH7 (55°C)	pH9 (53°C)
Octil	1.5 ± 0.1	1 ± 0.1	0.70 ± 0.05
Octil-PEI	9.1 ± 0.5	2.4 ± 0.3	0.75 ± 0.05
Octil-DS	4.1 ± 0.2	0.6 ± 0.05	0.85 ± 0.05
CNBr	0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.65 ± 0.05
CNBr-PEI	2.7 ± 0.1	0.6 ± 0.05	0.55 ± 0.05
CNBr-DS	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.80 ± 0.1

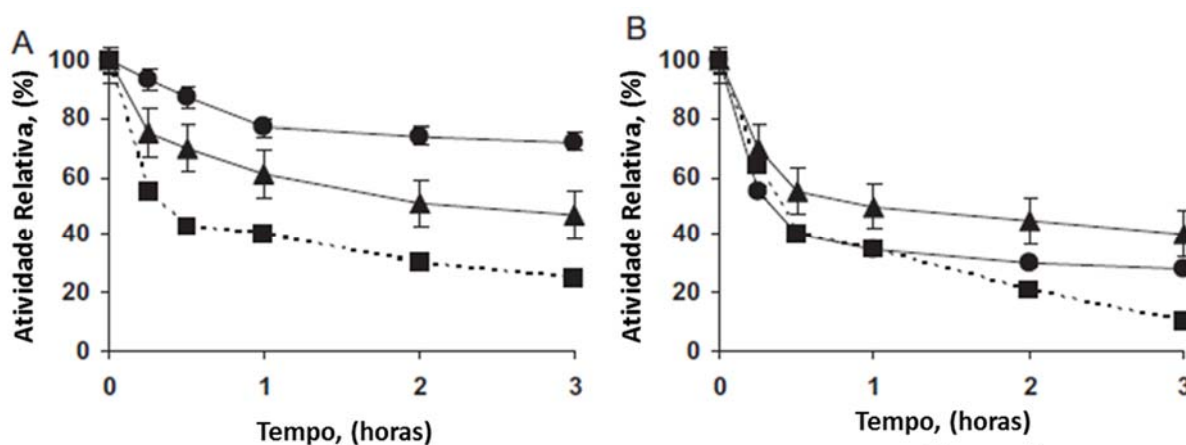
Fonte: Elaborada pelo autor.

A pH 5, o revestimento com PEI aumentou significativamente a estabilidade de ambas as preparações de enzima (em cerca de 6 vezes), enquanto o revestimento com DS tem um efeito mais baixo (3-4 vezes). A pH 7, a PEI melhorou por um fator de duas vezes a meia - vida da preparação em octil, enquanto que usando DS melhorou por um fator de 3 vezes a estabilidade da preparação covalente e reduziu pela metade a estabilidade da preparação com octil. A pH 9, ocorreu apenas um aumento de 3 vezes na estabilidade da preparação covalente, que pode ser encontrado usando revestimento com DS.

A **Figura 9.5** mostra a inativação dos 6 biocatalisador em 30% de acetonitrila (escolhido por ter uma taxa de inativação suficientemente rápida). A CNBr-Lecitase apresentou melhora na estabilidade após incubação com ambos os polímeros, por 6-7 vezes usando PEI e por cerca de 30 vezes usando DS. O efeito positivo do revestimento do polímero pode ser relacionado com uma hidrofilição da enzima com o nano-ambiente que pode produzir alguma partição do solvente orgânico para longe da enzima (WILSON *et al.*, 2004; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1999).

Como a enzima pode ser exposta a uma concentração mais baixa de solvente, produzindo uma melhoria significativa na estabilidade da enzima, temos por outro lado que, este efeito foi mais baixo em octil-Lecitase, provavelmente, porque a enzima talvez seja desorvida a partir do suporte utilizando esta concentração de solvente (uma pequena quantidade de proteína podia ser detectada no sobrenadante após inativação).

Figura 9.5 - Curso de inativação de diferentes preparações Lecitase em 30% de acetonitrilo. Atividade foi determinada como descrito na seção Métodos a 25 °C. 100% foi a atividade máxima para cada biocatalisador. Painel A: CNBr-Lecitase, Painel B: octil-Lecitase. Quadrados, linha tracejada: preparação não modificada; Triângulos, linha sólida: biocatalisador revestido com PEI; Círculos: biocatalisador revestido com DS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, o revestimento de Lecitase imobilizada com DS ou PEI permitiu em alguns casos, aumentar a estabilidade da enzima, e não apresentou um efeito negativo significativo em qualquer circunstância. Embora a PEI produzisse certa hiperativação da enzima, este efeito positivo depende da estratégia de imobilização e do polímero utilizado.

9.3.4.3 Especificidade das diferentes preparações de Lecitase

Conforme Rodrigues *et al.* (2013), tem sido amplamente demonstrado que a imobilização e modificação química altera as propriedades de lipase, por conseguinte o efeito do revestimento com polímero sobre a atividade da enzima em comparação com um substrato pode ser diferente contra outros substratos. A **Tabela 9.3** mostra a atividade das diferentes preparações de Lecitase contra diferentes ésteres de ácidos carboxílicos: um alifático (hexanoato de etila), um aromático (fenilacetato de etilo) e um aromático com um grupo hidroxilo em posição alfa (ácido mandélico), em três valores de pH diferentes. Ácido mandélico é um composto quiral, deste modo, os isómeros *R* e *S* foram analisados.

Tabela 9.3 - Atividade de diferentes preparações de Lecitase contra diferentes substratos. Os detalhes experimentais podem ser encontrados na seção de métodos. EH: hexanoato de etila; MPA, fenilacetato de metila; RMM: *R* metil mandelato; nda: nenhuma atividade detectável. A atividade é determinada como U/mg.

pH /substrato (R/S relação de atividade)	Atividade de cada preparação de Lecitase ($\times 10^3$)					
	CNBr	CNBr-PEI	CNBr-DS	Octil	Octil-PEI	Octil-DS
pH 5/EH	nda	15.0 ± 1	nda	2.35 ± 0.05	17.0 ± 1	2.55 ± 0.1
pH 7/EH	0.9 ± 0.05	1.0 ± 0.05	0.16 ± 0.02	12.9 ± 1	14 ± 01	1.12 ± 0.05
pH 8.5/EH	nda	nda	nda	2.5 ± 0.2	7.5 ± 0.5	0.87 ± 0.05
pH 5/MPA	0.39 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.013 ± 0.002	0.4 ± 0.02	nda
pH 7/ MPA	1.93 ± 0.05	1.60 ± 0.05	1.60 ± 0.05	0.12 ± 0.1	0.11 ± 0.01	0.051 ± 0.002
pH 8.5/ MPA	1.63 ± 0.05	0.4 ± 0.02	1.20 ± 0.05	0.10 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.071 ± 0.002
pH 5/R-MM	14.2 ± 0.5	16 ± 1	10 ± 1	2.4 ± 0.1	9.5 ± 0.5	1.3 ± 0.1
(VR/VS)	(0.55 ± 0.1)	(0.55 ± 0.1)	(0.49 ± 0.1)	(0.41 ± 0.05)	(0.53 ± 0.1)	(0.34 ± 0.1)
pH 7/R-MM	170 ± 20	160 ± 20	140 ± 10	5.6 ± 0.2	12.9 ± 0.3	3.9 ± 0.1
(VR/VS)	(1.21 ± 0.1)	(1.22 ± 0.1)	(1.3 ± 0.1)	(0.46 ± 0.1)	(0.63 ± 0.05)	(0.47 ± 0.05)
pH 8.5/R-MM	190 ± 20	190 ± 20	160 ± 15	2.1 ± 0.4	13.9 ± 3	5.0 ± 1
(VR/VS)	(1.6 ± 0.1)	(1.7 ± 0.1)	(2 ± 0.2)	(0.26 ± 0.4)	(0.72 ± 0.5)	nda

Fonte: Elaborada pelo autor.

Começando com o hexanoato de etila, a preparação octil é muito mais ativa do que a covalente. De fato, a atividade do CNBr -Lecitase foi detectada apenas em pH 7. O derivado com Octil apresentou a atividade máxima a pH 7 contra esse substrato, em oposição aos resultados obtidos utilizando p-NPB. A modificação da preparação octil com DS produziu

uma queda muito significativa na atividade, em cerca de 50 %, a pH 5 e 7, e de 30 % a pH 8,5. A modificação com PEI produziu um aumento muito significativo da atividade em pH 5, quase 8 vezes, sendo neste pH onde a atividade máxima foi encontrada, um aumento moderado a pH 7 (em torno de 15%) e uma diminuição significativa da atividade a pH 8,5 (por 60%) foram verificados.

Usando a preparação covalente, alguns resultados são ainda mais surpreendentes. A atividade da preparação subiu em pH 5, após incubação em PEI, tornando-se na mesma faixa de atividade, como o derivado octil – Lecitase modificada com PEI (quando a atividade não podia ser detectada antes da modificação). A pH 7, o aumento de atividade é muito menor (apenas 15 %) e a pH 8,5, a atividade é ainda não detectável. Usando CNBr-Lecitase modificada com o DS, a atividade só foi detectada a pH 7, e foi 5 vezes menor do que a do biocatalisador não modificado.

Usando fenilacetato, a preparação covalente foi mais ativa, cerca de 15 vezes em pH 7 e pH 8,5 e cerca de 30 vezes a pH 5. Ambas as preparações tinha a atividade máxima a um pH de 7. A incubação de octil - Lecitase com PEI permitiu aumentar consideravelmente a atividade a pH 5 (30 vezes), atingindo níveis semelhantes aos da preparação com CNBr não modificado. No entanto, a atividade em pH 7 diminuiu em 15 % e aproximadamente 4 vezes, a pH 8,5. Por outro lado, o revestimento com o DS diminuiu a atividade enzimática em todos os casos em relação ao biocatalisador não modificado.

Usando a preparação covalente, o quadro é bastante diferente. Os efeitos com PEI são semelhantes, com um aumento significativo no pH 5 (mas desta vez apenas dobrando a atividade da enzima não modificada), uma ligeira diminuição em pH 7 (85 %), e uma diminuição mais significativa a pH 8,5 (a 20 %). Usando DS como agente de revestimento, a atividade diminuiu, comparado ao derivado CNBr-Lecitase não modificado em todos os valores de pH estudados. No entanto, a pH 8,5 a atividade desta enzima modificada com DS é mais elevada do que a da preparação com PEI.

Usando os substratos mais complexos, *R* e *S*-metil mandelato, os resultados foram novamente muito diversos para as diferentes preparações. A preparação covalente é mais ativa que o derivado octil-Lecitase (quase 100 vezes a pH 8,5 para o isômero *R*). A atividade máxima para a preparação covalente é obtida a um pH de 8,5; enquanto que a enzima adsorvida teve este máximo, a pH 7 (diferente dos valores encontrados usando os outros substratos). Ambas derivados apresentaram atividade menor em pH 5.

Além disso, a preparação covalente teve quase nenhuma discriminação entre ambos os isômeros e a pequena preferência enantio dependia do pH. Com pH 7 e o 8,5, o isômero *R* é preferido (VR/VS é de 1,2 ou 1,6), e a um pH de 5, a preferência é o isômero *S* (uma razão de 0,6). Os derivados de octil- Lecitase mostraram preferência pelo isômero *S*, com VR/VS em torno de 0,5 a pH 5 e 7, e 0,26 em pH 8,5 .

O revestimento com PEI da preparação com octil aumentou a atividade versus o isômero *R* em todos os valores de pH, desde de 2 vezes a pH 7 a 6 vezes a pH 8,5. As taxas (VR/VS) permanecem em valores semelhantes, apenas a pH 8,5 ocorreu uma piora significativa deste parâmetro. O tratamento com DS produziu um decréscimo da atividade enzimática em todos os valores de pH (para menos de 50 % em todos os valores de pH).

Usando a preparação covalente, o tratamento com PEI não teve nenhum efeito significativo sobre a atividade contra o isômero *R* ou relações de atividade, em qualquer valor de pH. O tratamento com DS gerou uma diminuição na atividade (máximo 30% a pH5), e proporcionou um ligeiro aumento na razão de atividades em pH 8,5. Assim, os efeitos da modificação com polímeros foram fortemente dependentes do substrato, das condições experimentais e do protocolo de imobilização.

Os efeitos do revestimento com PEI variaram de um incremento da atividade da enzima de 30 vezes a decréscimos de quatro vezes, dependendo do substrato e das condições. O DS não teve um efeito claramente positivo sobre a atividade, mas ao mesmo tempo, em certas condições e com certos substratos a redução é muito pequena, em outros casos, tornou-se bastante significativa. Os efeitos do pH, neste caso, podem estar relacionados no modo como o revestimento com o polímero afeta os movimentos da enzima, mas também na forma como o pH fortalece ou enfraquece as interações com a enzima.

Uma hipótese que pode explicar estes resultados heterogêneos é que o revestimento da Lecitase com os polímeros iônicos produziu alguma distorção na estrutura da enzima ou apenas evitou o movimento completo da tampa. Estas mudanças na estrutura da enzima podem produzir alterações na conformação do centro ativo da enzima, e este "novo" centro ativo pode ser mais ou menos eficiente dependendo do substrato. É semelhante a gerar uma "nova lipase" que talvez seja melhor para alguns substratos e pior para outros.

9.5 Conclusões

A incubação de Lecitase imobilizada em soluções com polímeros iônicos permite revestir as enzimas com o polímero, e este revestimento produziu alterações muito significativas nas propriedades da enzima. O revestimento com PEI aumentou a atividade da enzima contra a maioria dos substratos, principalmente em pH 5, enquanto DS geralmente produziu uma atividade enzimática decrescente.

No entanto, os efeitos do revestimento não foram semelhantes utilizando CNBr-Lecitase ou octil-Lecitase, e não têm o mesmo efeito qualitativo usando qualquer substrato ou condições experimentais. O aumento de atividade causada pelo revestimento de PEI parece não estarem relacionados com a estabilização da forma aberta da Lecitase, assim, os efeitos podem estar relacionados com geração de uma nova estrutura da enzima, que parece ter alguns efeitos positivos na atividade enzimática. Assim, o efeito de uma modificação na enzima deve ser avaliado em um substrato que vai ser utilizado, pois os resultados podem não ser qualitativamente semelhantes.

Além disso, o revestimento com os dois polímeros DS e PEI produziu alguns efeitos benéficos sobre a estabilidade da enzima, em certas condições. Mais uma vez, este efeito positivo depende da preparação e das condições de inativação. Tendo em vista a melhoria da atividade que o revestimento de PEI produziu em Lecitase, este efeito positivo do revestimento de polímero sobre a estabilidade da enzima sugere que o polímero pode permanecer adsorvido à enzima, mesmo a alta temperatura.

Os resultados mostrados e descritos neste capítulo estão dispostos e publicados no periódico: **Enzyme and Microbial Technology**, Volume 60, 10 June 2014, Pages 1–8. O mesmo documento pode ser verificado e consultado no anexo B. desta Tese, e como bibliografia regular nas referências desta produção.

Capítulo 10

Estabilização de estruturas hiperativadas de Lecitase através da modificação física com polímeros iônicos

Os dados apresentados neste capítulo estão publicados em:

SANTOS, JOSE C. S. DOS; GARCIA-GALAN, CRISTINA; RODRIGUES, R.C.; SANT'ANA, H.B.; LUCIANA R.B. GONÇALVES; FERNANDEZ-LAFUENTE, ROBERTO. Stabilizing hyperactivated lecithase structures through physical treatment with ionic polymers. **Process Biochemistry** (1991), v. 49, n.9, p. 1511–1515, 2014.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.009>

10.1. Resumo

Lecitase Ultra foi imobilizada covalentemente em brometo de cianogênio agarose (CNBr) reticulada 4%, mantendo 70% da atividade inicial. A atividade da enzima imobilizada foi melhorada na presença de Triton X-100, dodecil-sulfato de sódio (SDS), e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (por exemplo, em até 800% quando CTAB foi utilizado). No entanto, CTAB e Triton X-100 apresentaram um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima, mesmo em baixas concentrações, e SDS não pode ser utilizado por um longo tempo na concentração de 1%. Para manter a conformação hiperativada da enzima na ausência de detergente, polímeros iônicos foram adicionados durante a incubação da enzima imobilizada na presença de detergentes. O revestimento da enzima imobilizada com polietilenimina (PEI) em tampão aquoso produziu um aumento de 3 vezes na atividade da enzima. No entanto, na presença de SDS a 0,1% (v/v), este revestimento produziu um aumento de 50 vezes na atividade da enzima. Usando PEI e 0,01% (v/v) de CTAB, a atividade Lecitase diminuiu para 10%. Usando inibidores irreversíveis, pode ser demonstrado que a preparação PEI/SDS-CNBr-Lecitase permitiu que seu sítio catalítico *Ser* (serina) ser mais acessível ao meio de reação que a preparação CNBr-Lecitase não modificada.

Palavras-chave: Lecitase. Hiperativação de enzima. Detergente. PEI. Modificação física em fase sólida. *Bioimprinting*.

10.2 Introdução

A melhoria da atividade da enzima é um dos alvos mais interessantes na produção de um biocatalisador. Este aumento de atividade é conseguido ao modificar a enzima utilizando diversas ferramentas, tais como mutagênese dirigida local (DUAN *et al.*, 2013), evolução dirigida (STEFFLER *et al.*, 2013; TURNER, 2009) a modificação química (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011), entre outros.

No entanto, deve considerar-se que, na maioria dos casos, as enzimas são utilizadas, em escala industrial, de uma forma imobilizada, para permitir a sua reutilização (se a enzima imobilizada é suficientemente estável). (DICOSIMO *et al.*, 2013; LIESE *et al.*, 2013). Assim, pode ser interessante para o desenvolvimento de estratégias que objetivam melhorar a atividade da enzima durante a preparação do biocatalisador, serem compatível com a estratégia de melhorar diretamente o desempenho da enzima através de ferramentas genéticas (RODRIGUES *et al.*, 2011; HERNANDEZ *et al.*, 2011).

A imobilização é, em muitos casos, associada a um decréscimo na atividade enzimática, por várias razões, por exemplo, a distorção da enzima, os problemas de difusão, problemas estéricos. No entanto, um protocolo de imobilização adequado pode manter, ou mesmo aumentar, a atividade da enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A melhoria da atividade pode ser encontrada em alguns casos, impedindo algumas das razões para a redução da atividade da enzima, tal como a inibição ou a distorção, enquanto em outros casos, através da produção de uma enzima conformação mais ativa. (RODRIGUES *et al.*, 2013)

As lipases têm um mecanismo catalítico chamado ativação interfacial. (VERGER *et al.*, 1997; BERG *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2009). O centro ativo é isolado, a partir do meio de reação, através de uma cadeia de oligopéptidos, chamada "aba" ou "tampa" (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991; TILBEURGH *et al.*, 1993).

A face interna da tampa é hidrofóbica e interage com os domínios hidrofóbicos que rodeiam o centro ativo. Esta tampa pode ser movida para fora expondo este bolso muito hidrofóbico para o meio. Esta conformação é instável em meio aquoso, fazendo com que as moléculas de enzima estejam na conformação "fechada", ou seja, sem atividade a maior parte do tempo. Na presença do seu substrato natural (uma gota de óleo), a bolsa hidrofóbica permite a adsorção da enzima sobre a sua superfície, a estabilização da conformação aberta e ativa da lipase, permitindo que a lipase para atuar na interface da gota de óleo e o sistema aquoso.

As lipases também têm sido hiperativada durante a preparação de biocatalisadores, usando condições nas quais a estrutura da enzima encontra-se aberta e capaz de ser ainda mais estabilizada nesta conformação. Nestes casos, a conformação aberta, tem sido tipicamente produzida utilizando detergentes; essas moléculas anfipáticas estabiliza a conformação aberta das lipases (GUNCHEVA *et al.*, 2007; HELISTÖ *et al.*, 1998), mas também pode atuar como inibidores (GARGOURI *et al.*, 1983), levando à sua inativação (MOGENSEN *et al.*, 2005; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

Assim, as lipases têm sido liofilizadas (MINGARRO *et al.*, 1995), onde precipitou reticulado (LÓPEZ-SERRANO *et al.*, 2002), ionicamente adsorvido (FILICE *et al.*, 2011), ou reticulada com glutaraldeído (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2006) na presença de detergentes para permitir a congelação da forma aberta, de modo que a conformação ativa e aberta irá persistir após o detergente ser eliminado.

Além disso, o revestimento físico em fase sólida de enzimas com polímeros iônicos é declaradamente um método bastante simples e rápido para a modificação da atividade da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2011). Este revestimento com polímeros iônicos tem sido proposto como um meio para melhorar a estabilidade da enzima, sob certas condições. (BRYJAK *et al.*, 1995). Por exemplo, a presença de solventes orgânicos ou de oxigênio por segregar estes reagentes hidrofóbicos a partir do ambiente da enzima (MATEO *et al.*, 2006; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1999), impedindo assim dissociação da enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2013). Em alguns casos, o revestimento de polímero de lipases foi reportado para melhorar o comportamento catalítico da enzima (por exemplo, a especificidade) (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2012; CABRERA *et al.*, 2010; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2009).

Lecitase Ultra é uma fosfolipase A1 comercial desenvolvida principalmente para os processos de degomagem (DE MARIA *et al.*, 2007), apesar de fosfolipases A1 poderem ter diferentes usos. (HAVN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006; NA *et al.*, 1990; DEVOS *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2006). Esta enzima tem sido obtida a partir da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, para conseguir uma boa estabilidade, e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum*, para obter a atividade da fosfolipase. (DE MARIA *et al.*, 2007)).

Com isso a enzima tem sido encontrada por se comportar como uma lipase padrão, com a capacidade de ser adsorvida nas superfícies hidrofóbicas, por exemplo, suportes hidrófobos (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007) e por apresentar uma ampla especificidade (YANG *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2013; LIU *et al.*,

2012a; LIU *et al.*, 2012b; LIU *et al.*, 2012c; MISHRA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010 e WANG *et al.*, 2011).

Assim, na atividade de pesquisa realizada, tentou-se obter a conformação aberta estabilizada de Lecitase Ultra, imobilizada em brometo de cianogênio agarose por ligação covalente, via modificação física com polímeros iônicos, “através de reticulação iônica” após a ativação por detergentes.

10.3 Materiais e Métodos

10.3.1 Materiais

A Lecitase foi doada pela Novozymes (Espanha), cerca de 16 mg de proteína/ mL, com uma atividade em pNPB de 5,6 U/mg de proteína. Brometo de cianogênio reticulado 4% (CNBr) foi obtido da GE Healthcare (Pollards Wood, UK). A Polietilenoimina (PEI ramificada, Mn de 10.000, Mw 25.000 Da), o dextrano sulfato (DS, médio Mw, 9000-20000 Da), p-nitrofenil butirato (p-NPB), o Triton X-100, o dodecil sulfato de sódio (SDS), o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e éter p-nitrofenilfosfato (D-pNPP) foram advindos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

10.3.2 Determinação da atividade enzimática

Este ensaio foi realizado através da medição do aumento da absorvância a 348nm produzidos pelo p-nitrofenol libertado na hidrólise de 0,4mM de p-nitrofenilbutirato (p - NPB) em fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e 25 °C (sob estas condições $\varepsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para iniciar a reação, 50-100µl de solução de lipase ou de suspensão foi adicionada a 2,55mL da solução de substrato. Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de p-NPB por minuto sob as condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, *et al.*, 1976) e albumina de soro bovino foi utilizada como referência.

10.3.3 Imobilização de Lecitase em CNBr agarose

Um volume de 2,8 mL de Lecitase comercial foi diluída em 67,5 ml de fosfato de sódio 5mM contendo 0,05% (m/v) de dodecil sulfato de sódio a pH7 , a 4°C. Em seguida, foi adicionado 15 g de CNBr. A atividade do sobrenadante e a suspensão foram seguidas usando pNPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte com etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Finalmente, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada abundante. O rendimento de imobilização foi superior a 90% e atividade expressa de 70%. (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014).

10.3.4 Revestimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos

O protocolo seguido foi previamente otimizado para o revestimento de Lecitase imobilizada com polímeros iônicos (SANTOS, *et al.*, 2014). Em que 10g de Lecitase imobilizada foram adicionados a 100 mL de PEI a um pH de 7 ou DS a pH 5 (1 mg/mL). Em alguns casos, o detergente, para a concentração desejada, foi adicionado 2 minutos antes da adição do polímero, mantendo-se esta mistura, sob suave agitação, durante um período máximo de 24 horas. A atividade foi seguida durante incubação, de acordo com o protocolo de atividade descrito acima com p-NPB.

10.3.5 Análise do efeito dos detergentes sobre a estabilidade de CNBr-Lecitase

Para verificar a estabilidade dos derivados de enzimas na presença de detergentes, 1g de enzima imobilizada foi suspenso em 5 mL de fosfato de sódio 10 mM a pH 7, a 25 °C. Periodicamente, foram retiradas amostras, e a atividade foi medida usando pNPB. Uma suspensão de CNBr-Lecitase na ausência de detergente foi utilizado como uma referência. O valor de atividade obtido utilizando a suspensão de referência, e adicionando à mistura de reação a quantidade equivalente de detergente em cada amostra (para distinguir efeitos de ativação / inibição do detergente presente nas suspensões problemáticas) foi tomada como 100% de atividade.

10.3.6 Inativação irreversível de Lecitase imobilizada na presença de D-pNPP

Diferentes preparações imobilizadas-lipase (0,8 g) foram suspensas em 5 mL de solução tampão de fosfato de sódio 100mM a pH7 em 25 °C. Em seguida, a D-pNPP foi adicionado até uma concentração de 1mM. Amostras desta suspensão foram retiradas periodicamente, e suas atividades foram verificadas utilizando como ensaio p-NPB.

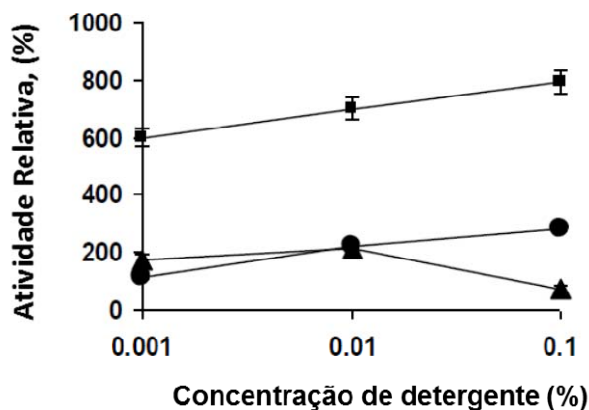
10.4 Resultados

10.4.1 Efeito do detergente nas propriedades da enzima

Três detergentes com características diferentes foram testados: CTAB, um surfactante catiônico; SDS, um agente tensoativo aniônico; e Triton X-100, um surfactante não iônico. A Figura 9.1 (p.XX) mostra os efeitos sobre a atividade enzimática de cada detergente. Na gama de concentrações estudadas, CNBr-Lecitase foi hiperativada na maioria dos casos. A maior hiperativação foi detectada usando CTAB (quase 8 vezes), e o efeito aumentou junto ao aumento da concentração de detergente. SDS teve um efeito positivo em baixas concentrações (aumentar o aumento da atividade por dupla em 0,01%). No entanto, a 0,1% de SDS, a atividade foi menor do que na ausência de SDS. Triton X-100 mostrou um efeito menor sobre a atividade da enzima em concentrações de detergente baixas, mas a 0,1%, a atividade foi quase três vezes maior do que o controle.

Além disso, a preparação enzimática foi incubada na presença destes detergentes para verificar o seu efeito sobre a estabilidade da enzima (Tabela 9.1). Utilizando 0,1% de SDS, a atividade enzimática observada depois de 24 h foi de quase 100%, enquanto que com 0,1 % de Triton X-100, a atividade diminuiu lentamente, e com CTAB, a atividade diminuiu rapidamente. A atividade recuperada após 24 horas foi de 80% utilizando Triton X-100, e 10% usando CTAB. A atividade recuperada foi maior quando foi utilizada uma concentração de 0,01% para ambos detergentes.

Figura 10.1- Efeito dos detergentes na atividade da Lecitase imobilizada. Atividade foi determinada utilizando pNPB como indicado na seção de métodos. Triângulos: SDS, quadrados: CTAB, Círculos: Triton X-100.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora os três detergentes apresentassem efeitos positivos sobre a atividade da enzima, sua presença na solução tinha um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima; o efeito foi mais significativo com o detergente mais hiperativante (CTAB). Usando SDS, foi observado um maior efeito de hiperativação quando utilizando uma concentração máxima de até 0,1% desse detergente, no entanto a concentração máxima que pode ser utilizada por um período de tempo prolongado foi de 0,01%.

Tabela 10.1- Efeito da presença de detergentes na atividade de CNBr-Lecitase. CNBr-Lecitase foi incubado a pH 7 e 25°C em 25mM de fosfato de sódio com concentração indicada de detergente, durante 24 h. Em seguida, as preparações foram lavadas e a atividade do biocatalisador foi medida utilizando pNPB (ver métodos). * 100 é a atividade inicial do biocatalisador.

Detergente	Concentração (%), (v/v)	Atividade recuperada(%)*
Ausente	-	100
Triton X-100	0.1	60±3
Triton X-100	0.01	80±3
SDS 0.1	0.1	100±5
SDS 0.01	0.01	100±4
CTAB	0.1	>10
CTAB	0.01	60±2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os efeitos positivos dos detergentes sobre a atividade da lipase é o mais provável, ao menos parcialmente, devido à estabilização da conformação aberta da enzima, embora

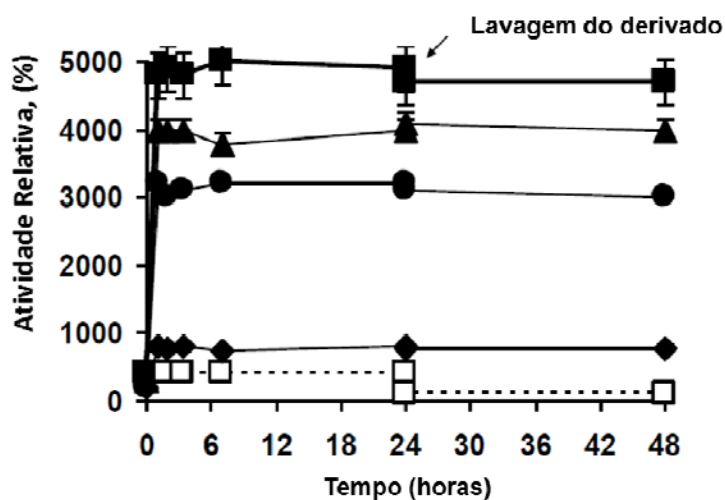
algumas outras alterações positivas na estrutura da enzima não possam ser desconsideradas. Os efeitos negativos podiam ser devido a uma distorção da estrutura da enzima ou a inibição da atividade enzimática.

Assim, no próximo conjunto de experimentos, tentou-se estabilizar as diferentes estruturas das enzimas promovidas pelos detergentes, através de revestimento da enzima com polímeros iônicos, uma vez que estas enzimas modificadas podem apresentar diferentes atividades.

10.4.2 Efeito da incubação da enzima imobilizada na presença de polímeros e detergentes.

A preparação CNBr-Lecitase foi incubada em diferentes concentrações de detergentes seguido pela adição de DS ou PEI para estabilizar a enzima modificada. A Figura 9.2 abaixo nos mostra a incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.

Figura 10.2 - Incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na ausência de polímero, a adição de surfactante aumenta a atividade da enzima cerca de 2 vezes, e a atividade manteve-se praticamente inalterada após 24h de incubação, a concentração máxima utilizada de SDS foi 0,1%. Depois da lavagem da enzima, numa solução tampão, a atividade inicial foi recuperada, perdendo a "hiperativação" causada pela presença de detergente.

Quando PEI é adicionado à suspensão de enzima, depois de vários minutos de incubação em SDS, a atividade aumentou fortemente, e este aumento na atividade é mais elevado que quando, aumentou-se a concentração de SDS, após 30 minutos, a atividade permaneceu inalterada durante 24 horas. Enquanto o revestimento da enzima imobilizada com PEI, na ausência de detergente induziu um aumento de 3 vezes na atividade, de acordo com o trabalho de Santos *et al.* (2014), a presença de 0,1% de SDS antes da adição de PEI melhorou a atividade enzimática em aproximadamente 45-50 vezes.

Depois de lavar com água, as preparações enzimáticas tratadas com os polímeros, a atividade da enzima imobilizada revestida com PEI, na presença de SDS, mantiveram similarmente níveis de hiperativação, mesmo após um mês de incubação a 25°C e um pH de 7. Já o revestimento de CNBr-Lecitase com DS levou a um decréscimo de aproximadamente 50% da atividade inicial na presença ou ausência de qualquer concentração de SDS, mesmo depois de lavar os derivados para eliminar o detergente (Tabela 9.2).

Tabela 10.2 - Atividade recuperada dos derivados de CNBr- Lecitase incubados em polímeros e /ou detergentes. O revestimento da enzima é descrito na seção de métodos. Atividade foi determinada utilizando pNPB como o substrato. O polímero foi adicionado à suspensão depois de incubação com o detergente. A atividade é dada como atividade relativa (100 corresponde a enzima não modificada) após 24 h de incubação no detergente e/ou polímero, lavagem com água e incubação a 25°C em tampão durante mais 24 h.

Detergente	Concentração (%) (v/v)	Polímero	Atividade relativa
Ausente	-	Ausente	100±5
Ausente	-	PEI	300±10
Ausente	-	DS	50±2
SDS	0,1	Ausente	100±5
SDS	0,002	PEI	800±30
SDS	0,01	PEI	3,000±100
SDS	0,05	PEI	4,000±150
SDS	0,1	PEI	5,000±150
SDS	0,002	DS	50±3
SDS	0,01	DS	45±2
SDS	0,05	DS	55±2
SDS	0,1	DS	50±2
CTAB	0,01	Ausente	70±5
CTAB	0,01	PEI	10±0.2
CTAB	0,01	DS	150±5
Triton X-100	0,01	Ausente	85±5
Triton X-100	0,01	PEI	400±20
Triton X-100	0,01	DS	15±3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Usando 0,01 % (v/v) de CTAB, na ausência de polímeros iônicos, a atividade

diminuiu a aproximadamente 70% após 24 h (Tabela 9.2, pag.XX). No entanto, foi observado que quando o PEI é adicionado à solução contendo CTAB, ocorreu uma hiperativação inicial, semelhante à encontrada usando PEI na ausência de surfactantes (resultados não mostrados), mas, após 24h, a atividade foi menor que o CNBr-Lecitase sem polímeros. Após a lavagem para eliminar o detergente, foi verificado uma diminuição da atividade em cerca de 10% (Tabela 9.2, pag. XX). Entretanto, ao usar DS, os resultados eram bem diferentes. Neste caso, o uso de 0,01% de CTAB causou uma hiperativação (150 %) verificada depois de lavar as preparações (Tabela 9.2, pag. XX).

Usando 0,01 % (v/v) de Triton X - 100, na ausência de polímeros, a atividade diminuiu ligeiramente após 24 h (15-20 %) (Tabela 9.2). Na presença de PEI, a atividade do biocatalisador foi 4 vezes mais elevada, um pouco maior do que quando foi utilizado PEI na ausência de surfactante (Tabela 9.2). Ao utilizar DS depois de incubar com Triton X - 100, foi observado uma atividade final cerca de 15% menor do que quando usando DS na ausência de detergente (Tabela 9.2).

O SDS tem efeitos positivos principalmente com PEI, enquanto que o CTAB (que tem um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima) tem certo efeito positivo sobre a atividade da enzima utilizando DS, o que é surpreendente porque DS teve um efeito negativo sobre a atividade enzimática e seria de esperar que ele favorecesse a acumulação de CTAB no ambiente da enzima. Aparentemente, diversos fatores estão contribuindo ao mesmo tempo para o sistema e, portanto, uma explicação simples destes resultados não pode ser determinada. No entanto, em alguns casos, um hiperativação muito importante foi identificado.

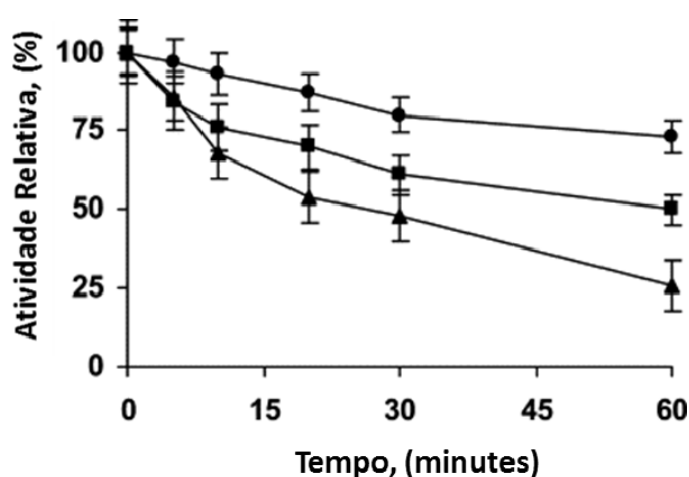
Assim, utilizando-se p-NPB como um substrato, o efeito mais positivo sobre a atividade da enzima ocorreu utilizando SDS seguido por revestimento de PEI, a produção de uma preparação de CNBr-Lecitase, aproximadamente 50 vezes mais ativa do que a preparação não modificado.

10.4.3 Estudo da acessibilidade dos resíduos catalíticos de Ser

Para verificar se este biocatalisador modificado apresenta uma serina catalítica que é mais acessível para o meio do que a preparação nativa por CNBr, ambos derivados Lecitase foram incubadas com D-pNPP para analisar a taxa de inibição irreversível (HELISTÖ, *et al.*, 1998). A Figura 9.3 (pag. XX) mostra que CNBr Lecitase revestido com PEI é inibida mesmo mais lento do que o não modificado CNBr Lecitase. No entanto, se o

revestimento de PEI foi realizada na presença de SDS, a taxa de inativação torna-se mais rápida do que a da preparação de CNBr-Lecitase.

Figura 10.3 - Inibição de diferentes preparações de Lecitase usando D-pNPP. Condições de inibição estão descritos na seção de materiais e métodos. A inativação foi seguida usando p-NPB para medir atividade. Quadrados: CNBr-Lecitase; triângulos: CNBr-Lecitase - SDS revestido com PEI; círculos: CNBr Lecitase-PEI.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, a preparação CNBr-Lecitase incubada em SDS e revestida com PEI permitiu o *Ser* catalítica ser mais expostos ao meio de reação do que a contrapartida não modificada, o que sugere que o biocatalisador Lecitase é estabilizado na forma aberta, enquanto a preparação sem polímero de Lecitase esta num equilíbrio entre as formas abertas e fechadas.

No entanto, a elevada hiperativação observada com p-NPB como substrato (cerca de 50 vezes) não se encaixa com o aumento da taxa de inibição (3-4 vezes em comparação com a enzima sozinha revestida com PEI), o que sugere que existem mais alguns causa para esta hiperativação do que apenas a estabilização de uma conformação aberta da enzima. Na verdade, tem sido relatado que alguns detergentes hiperativa Lecitase imobilizada em octil-agarose, que já está na conformação aberta da enzima (GARCIA-GALAN, *et al.*, 2014).

Segundo Santos, *et al.* (2014) o revestimento com PEI, na ausência de detergente aumentou a atividade da enzima em proporção de 3 vezes, enquanto que reduziu a taxa de inibição irreversível por D-pNPP, sugerindo que a PEI pode promover algumas mudanças conformacionais que fazem a enzima mais ativa, mas não de uma forma que está relacionada

com a estabilização da conformação aberta de Lecitase. Aparentemente, na presença de SDS, estas alterações conformacionais produzidas pelo polímero são ainda mais positivas.

10.4 Conclusões

A atividade da preparação CNBr-Lecitase pode ser aumentada pela incubação com baixas concentrações de detergentes, a atividade final é resultante de vários fatores: a estabilização da forma aberta da lipase, a inibição de enzimas e da distorção. No entanto, para além das complicações o resultado final proposto em utilização industrial seria que detergentes têm alguns efeitos deletérios sobre as propriedades Lecitase, que afetam principalmente a sua estabilidade. A incubação desta preparação imobilizada em soluções de detergente e outro revestimento da enzima com polímeros iônicos permitiu obter preparações hiperativada.

No entanto, foi necessário selecionar um polímero apropriado e detergente para maximizar os efeitos positivos, e esta seleção deve basear-se em estudos empíricos, devido à complexidade do processo envolvido. Além disso, espera-se que esta estratégia possa ser útil para a obtenção de preparações de lipase hiperativada de outras preparações imobilizadas covalentemente. Neste caso, a incubação em SDS da Lecitase imobilizada seguida por revestimento com PEI melhorou a atividade de 50 vezes, a estabilização da conformação aberta e ativa da lipase, com uma exposição mais elevada da *Ser* catalítica, que pode, pelo menos parcialmente, explicar este aumento na atividade. Outros polímeros, tais como o DS, ou outros detergentes (CTAB e Triton X-100), produziram muito mais reduzidas, e, em alguns casos, mesmo negativos, o efeito sobre a atividade da enzima.

Segundo Santos, *et al.* (2014), a interação do polímero com a proteína pode promover efeitos diferentes, que podem conduzir a uma afinação final das propriedades das enzimas, onde a hidrofilição global da superfície da enzima pode alterar o fechamento/abertura em equilíbrio. Esses polímeros podem gerar alguns empecilhos para os movimentos da tampa, ou pode favorecer a partição de substâncias diferentes. Os efeitos de polímero podem ser diferentes dependendo da sua natureza catiônica ou aniônica, por causa da área envolvida nas interações polímero/enzima.

Os resultados mostrados e descritos neste capítulo estão dispostos e publicados no periódico: **Process Biochemistry**, Volume 49, Pages 1511-1515. O mesmo documento pode ser verificado e consultado no anexo B. desta Tese, e como bibliografia regular nas referências desta produção.

CONCLUSÃO

Os grupos introduzidos no suporte por tratamento com divinilsulfona possuem uma série de características que os convertem em uma boa alternativa para a imobilização covalente multipontual: alta estabilidade a diferentes pHs, capacidade para reacionar com diferentes cadeias laterais, além de poderem ser bloqueados com diferentes moléculas.

Um correto protocolo de imobilização é necessário para tirar o máximo aproveitamento das propriedades do suporte: após a imobilização é necessário uma incubação a pH alcalino para se conseguir uma intensa união covalente multipontual, dessa forma é conveniente explorar a imobilização em diferentes condições.

Foi confirmada por análise de aminoácidos que a união, de acordo com o protocolo otimizado, é multipontual e pode envolver pelo menos os grupos Lys, Tyr, His, Cys. Isto permite estabilizar de forma muito significativa muitas enzimas, como a quimotripsina (superando até mesmo o suporte glioxil agarose), tripsina, CALB ou TLL.

Embora com muitas enzimas os resultados sejam muito favoráveis, em alguns casos a imobilização provoca a inativação total da enzima, em outros a enzima não se imobiliza.

A imobilização em diferentes valores de pH permite a imobilização das proteínas por diferentes orientações, o que permite conseguir diferentes valores de atividade/estabilidade.

A imobilização de lipases neste tipo de suporte permite a modulação de suas propriedades de duas formas: variando a orientação da molécula de enzima imobilizada por alterar as condições de imobilização, varia as interações com o suporte mudando o grupo bloqueante.

A modificação química de Lecitase Ultra permite alterar de forma muito significativa suas propriedades; estabilidade, atividade, especificidade e resposta frente ao meio.

Os efeitos da modificação química dependem do protocolo de imobilização.

O recobrimento de Lecitase Ultra com polímeros iônicos permite alterar de forma muito significativa sua atividade, estabilidade, especificidade e resposta frente ao meio.

O recobrimento de moléculas de Lecitase imobilizada com polímeros na presença de detergente permite estabilizar a forma aberta, que se mantém assim de forma hiperativada após eliminação do detergente evitando os problemas que estes originam na estabilidade da enzima.

Anexo A

Resumen de la tesis en castellano

**Optimización de Biocatalizadores: Diseño de Estrategias para la Modulación del
Propiedades de Enzimas por Técnicas Físico-Químicas.**

Doctorando: José Cleiton Sousa dos Santos

Directores: LUCIANA ROCHA BARROS GONÇALVES

ROBERTO FERNANDEZ LAFUENTE

Tutor: JOSE BERENGUER CARLOS

INTRODUCCION

Su elevada actividad catalítica en condiciones suaves, así como su gran selectividad y especificidad, he hecho que las enzimas se consideren como catalizadores con muy buenas perspectivas de uso en la industria (química fina o analítica, alimentaria, energía, etc.). Sin embargo, debido a su origen biológico, las enzimas tienen algunas características que no las hacen adecuadas para su uso como catalizadores industriales. Entre ellas, podemos destacar que las enzimas son catalizadores solubles en medios acuosos (lo que dificulta su separación del medio de reacción y reuso) que presentan una moderada estabilidad, en ocasiones muy baja, en las condiciones de uso industrial. También en muchos casos el sustrato de interés se aleja mucho del sustrato fisiológico, y frente a este sustrato la actividad, especificidad o selectividad pueden no ser las adecuadas.

La solubilidad de las enzimas puede solucionarse mediante los procesos de inmovilización. Y dado que la inmovilización es un requerimiento en muchos casos para la preparación de un catalizador industrial, muchos investigadores han realizado un gran esfuerzo para acoplar la inmovilización a la solución de otras limitaciones de las enzimas. Por ejemplo, si se consigue que la enzima se una a un soporte rígido por muchos puntos, a través de brazos espaciadores cortos, garantizamos que las distancias relativas de estos grupos

deban de mantenerse casi inalteradas antes cualquier agente distorsionante, y esto debe de producir un aumento significativo de la estabilidad de la enzima.

Un grupo activo del soporte útil para conseguir una intensa unión covalente multipuntual (UCM) debe de reunir una serie de propiedades: ser estable en condiciones de pH alcalino, no ofrecer impedimentos estéricos a la reacción y poder reaccionar con grupos situados en la superficie de la proteína (normalmente aminos primarios son los preferidos). Los grupos epóxido han mostrado cierta utilidad para este fin, pero su reactividad es muy baja y el grado de UCM conseguido no es muy elevado. El entrecruzamiento de enzimas con soportes utilizando glutaraldehído tras adsorber enzimas en soportes conteniendo aminos primarios ha conseguido buenos resultados, pero implica una modificación química masiva de la proteína y el soporte final es un intercambiado aniónico con cierta hidrofobicidad, lo que puede originar ciertos problemas. Los soportes con grupos glioxil han mostrado ser los más eficaces para producir una UCM muy intensa, pero tiene dos problemas: incluso la primera inmovilización debe de realizarse a pH 10, y es preciso reducir el biocatalizador con borohidruro sódico. Por ello parece interesante encontrar algún otro método de activación de soportes que pueda ser aplicado para conseguir intensas uniones covalentes multipuntuales.

En este sentido, la divinilsulfona (DVS) ha sido descrita como un reactivo que permite realizar la activación relativamente sencilla de soportes con grupos hidroxilo o amino (primario o secundario). El grupo vinil sulfona remanente puede reaccionar a su vez con grupos amino, hidroxilo o tiol de las cadenas terminales de una proteína. Sin embargo, apenas hay algún ejemplo de su uso para inmovilizar proteínas, y casi todos en el área de biosensores. No hay datos de la estabilización conseguida a través de este método, apenas de la actividad expresada por las enzimas, tampoco datos de la reactividad del soporte con las distintas cadenas laterales de los aminoácidos en distintas condiciones, ni la de la estabilidad de los

grupos vinilsulfona del soporte. También es importante encontrar un protocolo sencillo de punto final para la interacción enzima-soporte. De esta forma, el primer objetivo de esta tesis es evaluar estos soportes como posible alternativa para conseguir una intensa unión covalente multipuntual, realizando la caracterización general del soporte y usándolo para inmovilizar/estabilizar varias enzimas.

Por otro lado, algunas enzimas pueden alterar sus propiedades de forma sencilla a través de los procesos de inmovilización o modificación química. Entre ellas están las lipasas y las fosfolipasas, que sufren grandes cambios conformacionales al cambiar de una forma cerrada e inactiva a una forma abierta y activa (activación interfacial). Los cambios son difíciles de predecir y la propuesta es realizar una colección de biocatalizadores lo más amplia posible para en algún caso los cambios de la enzima sean favorables.

En cuanto al efecto de la inmovilización, se ha demostrado que el inmovilizar las enzimas a un soporte a través de diferentes regiones, con diferente grado de interacción, se puede conseguir alterar de forma muy significativa no solo la estabilidad sino a especificidad o la selectividad de las lipasas. Dado que los soportes DVS son capaces de reaccionar con varios aminoácidos de naturaleza diferente, quizás preferentemente con uno u otro dependiendo de las condiciones experimentales, se intentara inmovilizar diversas lipasas en diferentes condiciones para alterar su orientación en el soporte y por lo tanto sus propiedades. Por otro lado, la superficie del soporte, en íntimo contacto con un gran porcentaje de la molécula de enzima, puede también afectar a su movilidad. Se utilizarán diferentes agentes bloqueantes para intentar alterar la función de diferentes enzimas inmovilizadas.

La modificación química o física de enzimas ya inmovilizadas también ha sido propuesta como muy útil para aumentar el tamaño de la colección de biocatalizadores con diferentes propiedades catalíticas. La aminación de los carboxilos por la ruta de la

carbodiimida alterara completamente el tipo de interacciones iónicas de la superficie de la lipasa, y por lo tanto puede alterar los cambios conformacionales asociados a la apertura y cierre de las lipasas. La modificación con TNBS de los grupos amino primario de la superficie de la proteína permitirá aumentar su hidrofobicidad, nuevamente con posibles efectos en la movilidad de la superficie. Y la modificación con glutaraldehído tendrá un posible triple efecto: por un lado, introducir grupos moderadamente hidrofóbicos en la superficie de la molécula, por otro lado podrá introducir entrecruzamientos intra o intermoleculares.

El recubrimiento de moléculas de enzima inmovilizadas con polímeros iónicos puede ser una modificación física de la superficie de la molécula de enzima con varios efectos: los movimientos de la estructura proteica se verán limitados por impedimentos estéricos, la proteína puede ver su estructura alterada, la superficie de la proteína será mucho más hidrofílica, etc.

Por otro lado, la estabilización de la forma abierta de las lipasas es un objetivo interesante, ya que puede permitir aumentar su actividad. La adsorción por activación interfacial en soportes hidrofóbicos es una alternativa de conseguir tener la forma abierta de las lipasas. También esta forma se estabiliza en presencia de detergentes, pero su uso en los medios de reacción es muy complicado (posibles efectos desestabilizantes, inhibitorios, dificultades en la recuperación del producto, etc). Para conseguir la estabilización de la forma abierta de la lipasa se ha propuesto la liofilización, la agregación seguida por entrecruzamiento o la inmovilización covalente en presencia de detergentes. En esta tesis, se intentará conseguir este objetivo por medio de la modificación física de la lipasa en presencia de detergentes por polímeros iónicos.

OBJETIVOS

- 1.- Caracterización de soportes agarosa activados con divinilsulfona para la estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual
- 2.- Desarrollo de protocolos para la inmovilización/estabilización de diversas enzimas en perlas de agarosa activadas con divinilsulfona.
- 3.- Modulación de lipasas por inmovilización en soportes activados con DVS en diferentes condiciones.
- 4.- Modulación de lipasas inmovilizadas por alteración de las propiedades físicas del soporte activados con DVS; efecto del agente bloqueante en las propiedades catalíticas.
- 5.- Modulación de lipasas inmovilizadas por modificación química.
- 6.- Modulación de lipasas inmovilizadas por modificación física con polímeros iónicos.
- 7.- Estabilización de la forma abierta de lipasas.

RESULTADOS

1.- Caracterización de soportes agarosa activados con divinilsulfona para la estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual

1.1.- Reactividad del soporte DVS con diferentes amidas de aminoácidos

Se hizo reaccionar las aminadas de Lys, Tyr, His y Cys (para proteger el amino libre del aminoácido) con el soporte a pH 5, 5 y 10. A pH 10, las Lys reaccionaban rápidamente, disminuyendo la velocidad a pH 7 y siendo extremadamente lenta a pH 5. Las His reaccionaban también en el rango pH 5/pH10, significativamente más rápido a pH 5 que las Lys. Las Cys reaccionaban muy rápido a pH 10 y 7, y más lentamente a pH 5. Las Tyr apenas reaccionaban incluso a pH 10. Así, parece que Lys, His y Cys serán los principales aminoácidos implicados en la inmovilización (con un peso relativo diferente dependiendo del

pH), aunque no se puede descartar que otros aminoácidos puedan implicarse tras la primera inmovilización en la UCM entre la enzima y el soporte.

1.2.- Estabilidad de los grupos VS del soporte

La reactividad de los soportes activados con DVS apenas variaba tras incubarse a pHs 5-10 por 24 h, lo que los convierte en muy útiles para incubaciones por largo tiempo tras inmovilizar las enzimas.

1.3.- Eliminación de la reactividad del soporte

Tras la inmovilización parece interesante disponer de un protocolo sencillo para eliminar la reactividad química del soporte. Se comprobó que tras incubar el soporte con 1 M de mercaptoethanol y compuestos con aminos primarios o grupos tioles la reactividad frente a la Lys-amida desaparecía, la reducción con borohidruro 1 mg/ml solo la hacía disminuir. Así pues, el bloqueo parecía la forma más sencilla de eliminar la reactividad química del soporte.

2.- Desarrollo de protocolos para la inmovilización/estabilización de diversas enzimas en perlas de agarosa activadas con divinilsulfona.

2.1- Inmovilización-estabilización de quimotripsina.

La quimotripsina se inmovilizó en una relación 1 g de soporte DVS/ 10 ml de enzima a pH 5, 7 y 10.

A pH 10, 90% de la enzima se inmoviliza en 2 h (el soporte con glioxil inmoviliza el 80% en el mismo tiempo). A pH 7, se inmoviliza el 75% en 24 h y a pH 5 solo el 10% en el mismo tiempo. El efecto sobre la actividad dependía de las condiciones de inmovilización. A pH 10, la actividad disminuía en un 25% tras 24 h, mientras a pH 7 caía al 35% (a pesar de la más lenta inmovilización) y a pH 5 la actividad se mantiene inalterada.

Se bloqueó el derivado preparado a pH 10 con diversos compuestos, y con etilendiamina se observó un aumento de un 70% de la actividad. Este tratamiento permitía también obtener los mejores valores de estabilidad.

Se bloquearon los derivados a las 2 h, a las 24 y a las 72, la estabilidad aumentaba de forma muy significativa entre las 2 y las 24 h, siendo mucho menor la estabilización observada si se prolongaba por 72 h, que además tenía un coste en actividad (caía al 50%).

A partir de aquí se estableció el siguiente protocolo de preparación de los derivados:
Inmovilización en una relación 1:3 para conseguir buenos rendimientos también a pH 5 y 7.

Incubación a pH 10 por 24 h

Bloqueo con EDA

Con este protocolo se inmovilizo quimotripsina en soportes DVS a pH 5, 7 y 10, y posteriormente se incubaron todos ellos a pH 10 por 24 h, bloqueándose después con EDA.

La estabilidad en todos los casos mejoraba con la incubación a pH 10, la preparación más estable fue aquella preparada a pH 10 e incubada 24 h antes del bloqueo, siendo la inmovilizada a pH 7 la menos estable en todos los casos. Los factores de estabilización dependían de las condiciones de inactivación, incluyo en algunas condiciones la enzima inmovilizada a pH 5 e incubada a pH 10 era ligeramente más estable que la inmovilizada a pH 10.

Esta preparación era 5-10 veces más estable que la enzima inmovilizada en glioxil-agarose, que se considera la preparación de esta enzima más estable descrita en la literatura. El análisis de aminoácidos no permitió asegurar que las Tyr o las His estuvieran implicadas en la UCM; pero si que al menos 8 Lys se veían implicadas en la UCM. También se observó la desaparición de al menos 5 de las Cys, que en principio deberían de estar implicadas en

puentes disulfuro. Este elevado número de enlaces enzima-soporte podía explicar al extrema estabilización encontrada para este catalizador.

2.2.- Inmovilización de tripsina en soportes activados con DVS

Se siguió el mismo protocolo que se estableció anteriormente, usando benzamidina para evitar autólisis. En este caso se encontró una diferencia muy significativa; la actividad contra el sustrato sintético no solo no disminuía, sino que aumentaba de forma extrema, en un factor que tras el bloqueo oscilaba entre 50 y 100 veces. La estabilidad conseguida era 3-4 veces inferior a la que se obtenía con soportes glioxil, pero la gran hiperactivación podía justificar esta menor estabilización. Nuevamente se analizaron los aa y se encontró que al menos 8 Lys estaban implicadas en la inmovilización, así como 2-3 Tyr, y parece que 1-2 Cys. No se podía asegurar que ninguna His estuviera implicada en la unión de la enzima al soporte. Estos resultados eran muy positivos considerando el gran aumento de actividad encontrado.

2.3. Inmovilización de penicilina G acilasa a soportes activados con DVS.

Esta enzima se inactivaba de forma muy significativa tras la inmovilización y apenas se conseguían estabilizaciones tras la inmovilización en las condiciones óptimas descritas para la quimotripsina.

2.4 Inmovilización de lipasas a soportes activados con DVS

Se ensayaron varias lipasas: la forma b de *Candida antarctica*, la lipasa de *Pseudomonas flurensceus*, la de *Rhizomucor miehie*, la de *Thermomyces lanuginosus* y una fosfolipsa, la Lecitasa Ultra de Novozymes. Una dificultad añadida en esta e tipo de enzimas fue que eran capaces de adsorberse por activación interfacial sobre los grupos introducidos, aparentemente suficientemente hidrofóbicos para las lipasas. Esto podía evitarse añadiendo detergentes.

Los resultados fueron muy diversos según la enzima. CALB y TLL podáis inmovilizarse a pHs 5, 7 y 10 con buenas recuperaciones de actividad. Lecitasa Ultra y PFL se inmovilizaban, pero se inactivaban al unirse al soporte. Y finalmente RML no se inmovilizaba al soporte a ningún pH, incluso en ausencia de detergente.

Se prepararon biocatalizadores con CALB en soportes activados con DVS a los 3 valores de pH, inmovilizándose la enzima en todos los casos al 100%. La mera inmovilización aumentaba la actividad a pH 10 (30%) mientras a pH 7 y 5 se producía una bajada de actividad. A pH 10 la actividad aumentaba de forma progresiva durante las primeras 48h, manteniéndose luego estable (170%). Si se inmovilizaba a pH 7, la actividad aumentaba un 220% durante la incubación alcalina, mientras si se inmovilizaba a pH 5 lo hacía en un 250%.

En cuanto a la estabilidad, todas las preparaciones la mejoraban tras la incubación alcalina. La preparación más estable era aquella inmovilizada a pH 7 e incubado a pH 10, los factores de estabilización dependían de las condiciones de inactivación. La estabilidad conseguida era superior a la de otros derivados covalentes, pero en general era inferior a la conseguida por activación interfacial en un soporte octil-agarosa.

Utilizando la enzima TLL. Los resultados eran similares (incluyendo una cierta hiperactivación de la enzima), pero el más estable era el preparado a pH 10 e incubado a pH 10, excepto si la inactivación era a pH 5, donde el más estable era la preparación inmovilizada a pH 7 e incubada a pH 10. La incubación en disolventes provocaba aumento de actividad al medir en agua, siendo complicado fijar vidas medias.

3.- Modulación de lipasas por inmovilización en soportes activados con DVS en diferentes condiciones.

Dado que CALB y TLL podían inmovilizarse a diferentes valores de pH, y considerando que tras la incubación alcalina se mantenían diferencias en actividad y estabilidad, los resultados sugerían que las enzimas se habían modificado por diferentes orientaciones. Y esto podía manifestarse si se determinaba la actividad de las enzimas en diferentes condiciones y frente a diferentes sustratos (metil mandelato, etil hexanoato y metil fenilacetato)). Efectivamente, se encontró que las condiciones de inmovilización alteraban de forma muy clara las propiedades de las enzimas. Por ejemplo, el mejor catalizador usando TLL en hidrolisis de metil mandelato a pH 5 era el preparado por inmovilización a pH 5 sin incubación posterior, mientras que si se hidrolizaba etil hexanoato el más activo era el que se sometía a incubación a pH 10. Incluso las condiciones ejercían un importante efecto en que derivado es el más activo, Por ejemplo, usando CALB para hidrolizar etil hexanoato, todos los derivados eran más activos a pH 5 excepto si al enzima era inmovilizada a pH 7 y después incubada a pH 10, que mostraba la máxima actividad a pH 7.

Tanto la diferente especificidad de las diferentes preparaciones como el diferente efecto de las condiciones experimentales confirmaban que la orientación de las enzimas inmovilizadas en diferentes condiciones de pH tenían diferente orientación.

4.- Modulación de lipasas inmovilizadas por alteración de las propiedades físicas del soporte activados con DVS; efecto del agente bloqueante en las propiedades catalíticas.

Dado que el soporte permitía introducir diferentes grupos con diferente naturaleza, se decidió analizar el efecto del agente bloqueante en las propiedades de CALB y TLL inmovilizadas. La orientación y el grado de unión covalente multipuntual eran por lo tanto idénticos, la única diferencia se basaba en las posibles interacciones entre la enzima y el soporte. Así, tras la inmovilización se bloqueó el soporte con etilendiamina, con aspártico, con His, con hexilamina, con mercaptoethanol, etc. La hexilamina provocaba la inactivación

de las enzimas, con lo que las actividades recuperadas eran muy bajas. Efectivamente, se pudo apreciar claramente como la naturaleza del agente bloqueante alteraba completamente las propiedades de las enzimas inmovilizadas, tanto la estabilidad como la actividad frente a diferentes sustratos, produciendo nuevamente una modulación de la especificidad de las enzimas. A modo de ejemplo, la CALB inmovilizada según protocolo óptimo y bloqueada con EDA era la que más actividad mostraba en hidrólisis mostraba a pH 5 en hidrólisis de etil hexanoato, mientras que a pH 9 era el biocatalizador bloqueado con Gly. El biocatalizador bloqueado EDA y el bloqueado con imidazol tenía propiedades similares en esta hidrólisis a pH 7, mientras a pH 9 y 5 el bloqueado con EDA era mucho más activo. Usando TLL, en hidrólisis de etil hexanoato el más activo era el bloqueado con Cys, mientras que en bloqueado con EDA era un 30% más activo en hidrólisis de metil mandelato a pH 7 y con este mismo sustrato el bloqueado con etanol amina era 3 veces más activo a pH 5. Situaciones similares se daban para todos los sustratos y ambos derivados, mostrando que tanto la especificidad como la influencia del medio eran muy diferentes cuando se cambiaba las propiedades del soporte. De esta forma, la etapa de bloqueo pasaba de ser un problema que alargaba la inmovilización de las enzimas en soportes DVS a una herramienta que permitía alterar las propiedades finales de los catalizadores. El bloqueo óptimo en términos de actividad dependía de la enzima, del sustrato y de las condiciones donde se realizaba la reacción. Y la estabilidad también dependía del agente bloqueante utilizado

5.- Modulación de lipasas inmovilizadas por modificación química.

Una vez mostrado como la versatilidad de los soportes DVS permitían modular las propiedades catalíticas de lipasas por variar su orientación y por variar la naturaleza de las interacciones con el soporte, se intentó conseguir lo mismo por modificación química de las

enzimas inmovilizadas. Además, se estudió si el protocolo de inmovilización podía tener un efecto en los efectos de la modificación química. Para ello se usaron dos protocolos muy diferentes: la activación interfacial en soportes octil-agarosa y la inmovilización covalente en soportes agarose activada con bromuro de cianógeno. Como enzima modelo, se decidió utilizar la fosfolipasa Lecitasa Ultra, una enzima artificial. Las modificaciones estudiadas fueron la aminación, la modificación con glutaraldehído, y con el ácido 2,4,6-trinitrobenzoico (TNBS), las enzimas aminadas también se modificaron con glutaraldehído y TNBS.

Se confirmó nuevamente que el protocolo de inmovilización afectaba las propiedades catalíticas de la Lecitasa, octil-Lecitase era más activo versus p-nitrofenilbutirato (pNPB) pero era menos activo versus metil fenilacetato que la preparación covalente.

Pero además se encontró por primera vez que el efecto de las modificaciones químicas depende de forma muy fuerte del protocolo de inmovilización utilizado. Eso hacía que algunas modificaciones de uno de los biocatalizadores fuera positiva mientras era negativa para otro. Además, se encontró que algunas modificaciones eran positivas en unas condiciones experimentales y negativas en otras. A modo de ejemplo, la modificación con glutaraldehído permite mejorar la estabilidad de ambos biocatalizadores a pH 7 y 9 (un factor de 10), pero solo si la enzima había sido previamente aminada se observaba un efecto estabilizante del tratamiento con glutaraldehído cuando se inactivaba a pH 5, a pesar de que se detectaba entrecruzamiento intermolecular por SDS-PAGE.

La aminación mejoraba la estabilidad de la enzima inmovilizada en octil-agarosa, mientras era levemente negativa si la enzima estaba inmovilizada covalentemente. La modificación con TNBS solo mejoraba la estabilidad de la enzima covalentemente inmovilizada cuando se inactivaba a pH 9 (un factor de 10).

También se apreciaban grandes cambios en la actividad de los derivados y en el efecto de las condiciones experimentales en la misma. Por ejemplo, usando octil-Lecitase la modificación con TNBS produce un descenso del 50% en la actividad de hidrólisis de pNPP, mientras si se modifica el derivado covalente la actividad sube un factor de 2,5. La aminación en cambio sube más la actividad del derivado no covalente (un 35% frente a un escaso 5%). Estas diferencias se detectaron en las curvas actividad/pH, en el efecto de los detergentes en la actividad de los catalizadores, así como cuando se utilizaban sustratos más complejos.

6.- Modulación de lipasas inmovilizadas por modificación física con polímeros iónicos.

En una segunda fase, se usaron los mismos derivaos de Lecitase Ultra para analizar las posibilidades de modular los catalizadores lipásicos mediante el recubrimiento físico con polímeros iónicos como la polietilenimina o el dextrano sulfato.

Se analizó la actividad contra diferentes sustratos así como la estabilidad de los catalizadores así obtenidos. Se analizaron los efectos de algunas variables que consideramos importantes para lograr un buen recubrimiento de las moléculas de enzima por le polímero, como el tamaño del polímero, la concentración del mismo, el pH de incubación, etc.

El recubrimiento con PEI en general permite mejorar la actividad enzimática, estos valores variaban con el método de inmovilización y el sustrato, por ejemplo oscilaban desde un factor de 3 a pH 7 en hidrólisis de pNPB usando la preparación covalente hasta un factor de 30 en hidrólisis de metil fenilacetato a pH 5. Sin embargo, el dextrano sulfato daba resultados negativos con todos los sustratos analizados, de nuevo de forma diferente según el tipo de inmovilización.

El recubrimiento con los polímeros mejora la estabilidad de las preparaciones en muchas de las condiciones usadas para realizar las inactivaciones, nuevamente esto dependía

del método de inmovilización y del polímero. Usando DS y el derivado covalente, la vida media aumentaba un factor de 30 en inactivaciones en 30% de acetonitrilo. En algunos casos, la estabilidad caía, como era tras tratar la preparación no covalente con DS e inactivarla térmicamente a pH 7.

7.- Estabilización de la forma abierta de lipasas.

Un reto interesante usando este tipo de enzimas es lograr obtener su forma abierta, esto debería de permitir conseguir aumentos significativos de la actividad enzimática. La estrategia propuesta fue forzar la apertura de la lipasa por adición de detergentes e intentar mantener esta forma abierta estabilizada por el recubrimiento/entrecruzamiento físico con polímeros iónicos como los usados anteriormente. Como biocatalizador inmovilizado no tenía sentido usar el activado interfacialmente, que ya tiene la forma abierta estabilizada, así que se usó el biocatalizador covalente.

En primer lugar se analizó el efecto de diversos detergentes en la actividad de la enzima Lecitase Ultra (Triton X-100, sodium dodecil sulfato (SDS), and bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB). Todos ellos aumentaban la actividad de la preparación (e.g., hasta 800 % usando CTAB). Sin embargo, CTAB y Triton X-100 presentaban un efecto muy negativo en la estabilidad de la enzima incluso a concentraciones muy bajas de detergente, y SDS no podía usarse a 1% a largo plazo (valor que daba los mayores niveles de hiperactivación con este detergente).

En una segunda fase, se añadieron PEI o DS a las enzimas inmovilizadas en presencia del detergente. Los mejores resultados se obtuvieron usando 0.1% SDS y PEI, lográndose aumentar 50 veces la actividad del biocatalizador en hidrólisis de pNPP (la PEI sola producía un aumento de 3 de la actividad). Esta forma hiperactivada se mantenía en ese estado tras una

semana de incubación en ausencia de detergente. Usando inhibidores irreversible,, se pudo demostrar que el grado de exposición de la Ser catalítica al medio de reacción era mucho mayor en la nueva preparación que usando solo la PEI. Esto sugería que la lipasa presentaba una forma más abierta tras el tratamiento en presencia de detergente.

CONCLUSIONES

1.-Los grupos introducidos en soportes por tratamiento con divinilsulfona tienen una serie de características que los convierten en una muy buena alternativa para la inmovilización covalente multipuntual: alta estabilidad a diferentes pHs, capacidad para reaccionar con diferentes cadenas laterales, tras la reacción pueden ser “inactivados” por bloqueo con diferentes moléculas.

2.- Un correcto protocolo de inmovilización es preciso para sacar el máximo partido de las posibilidades del soporte: tras la inmovilización es preciso una incubación a pH alcalino para conseguir una intensa unión covalente multipuntual, pero es conveniente explorar la inmovilización en diferentes condiciones.

3.- Se ha confirmado por análisis de aminoácidos que la unión siguiendo el protocolo optimizado es multipuntual y puede implicar al menos a Lys, Tyr, His y Cys. Esto permite estabilizar de forma muy significativa muchas enzimas, como la quimotripsina (incluso superando al soporte glioxil agarosa), tripsina, CALB o TLL.

4.- Aunque con muchas enzimas los resultados son muy favorables, en algunos casos la inmovilización provoca la inactivación total de la enzima, en otros la enzima no se inmoviliza.

5.- La inmovilización en diferentes valores de pH permite inmovilizar las proteínas por diferentes orientaciones, lo que permite conseguir diferentes valores de actividad/estabilidad.

6.- La inmovilización de lipasas en este tipo de soportes permite la modulación de sus propiedades de dos formas: varía la orientación de la molécula de enzima inmovilizada por alterar las condiciones de inmovilización, varía las interacciones con el soporte cambiando el grupo bloqueante.

7.- La modificación química de Lecitase Ultra permite alterar de forma muy significativa sus propiedades; estabilidad, actividad, especificidad y respuesta ante el medio podían alterarse forma muy significativa.

8.- Los efectos de la modificación química dependen del protocolo de inmovilización.

9.- El recubrimiento de Lecitase Ultra con polímeros iónicos permite alterar de forma muy significativa su actividad, estabilidad, especificidad y respuesta ante el medio.

10.- Los efectos de la modificación física con polímeros dependen del protocolo de inmovilización.

11.- El recubrimiento de moléculas de Lecitasa inmovilizada con polímeros en presencia de detergente permite estabilizar la forma abierta, que se mantiene así de forma hiperactivada tras eliminar el detergente evitando los problemas que estos originan en la estabilidad de la enzima.

Anexo B

Artigos publicados

ANEXO B - Artigos publicados:

Author's personal copy

Process Biochemistry 49 (2014) 604–616



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol

Cristina Garcia-Galan^{a,1}, José C.S. dos Santos^{a,b,1}, Oveimar Barbosa^c, Rodrigo Torres^c,
Ernandes B. Pereira^d, Vicente Cortes Corberan^a, Luciana R.B. Gonçalves^b,
Roberto Fernandez-Lafuente^{a,*}

^a Instituto de Catálisis-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^b Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, CEP 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil

^c Escuela de Química, Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Edificio Camilo Torres 210, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

^d Universidade Federal de Alfenas, 37130-000 Alfenas, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2013
Received in revised form 20 January 2014
Accepted 23 January 2014
Available online 30 January 2014

Keywords:

Enzyme immobilization
Enzyme chemical modification
Enzyme stabilization
Enzyme hyperactivation
Glutaraldehyde
2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid

ABSTRACT

Lecitase Ultra (a quimeric fosfolipase commercialized by Novozymes) has been immobilized via two different strategies: mild covalent attachment on cyanogen bromide agarose beads and interfacial activation on octyl-agarose beads. Both immobilized preparations have been submitted to different individual or cascade chemical modifications (amination, glutaraldehyde or 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) modification) in order to check the effect of these modifications on the catalytic features of the immobilized enzymes (including stability and substrate specificity under different conditions). The first point to be remarked is that the immobilization strongly affects the enzyme catalytic features: octyl-Lecitase was more active versus *p*-nitrophenylbutyrate but less active versus methyl phenylacetate than the covalent preparations. Moreover, the effects of the chemical modifications strongly depend on the immobilization strategy used. For example, using one immobilization protocol a modification improves activity, while for the other immobilized enzyme is even negative. Most of the modifications presented a positive effect on some enzyme properties under certain conditions, although in certain cases that modification presented a negative effect under other conditions. For example, glutaraldehyde modification of immobilized or modified and aminated enzyme permitted to improve enzyme stability of both immobilized enzymes at pH 7 and 9 (around a 10-fold), but only the aminated enzyme improved the enzyme stability at pH 5 by glutaraldehyde treatment. This occurred even though some intermolecular crosslinking could be detected via SDS-PAGE. Amination improved the stability of octyl-Lecitase, while it reduced the stability of the covalent preparation. Modification with TNBS only improved enzyme stability of the covalent preparation at pH 9 (by a 10-fold factor).

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Phospholipases A₁ hydrolyze the 1-acyl group of a phospholipid to a lysophospholipid and a free fatty acid. They are of particular interest for industrial applications, to produce 2-acyl-lysophospholipids (good emulsifiers), glycerides with interesting fatty acid composition (eicosapentaenoic acid, conjugated linoleic acid and docosahexaenoic acid) and degumming process of oils

[1–5]. Due to their interesting applications, new phospholipases have been screened and discovered in the recent years [6–8]. In this context, a new enzyme preparation with phospholipase A₁ activity, namely Lecitase[®] Ultra, has been patented and made commercially available [9]. Following the supplier information, this is a preparation obtained from the fusion of the genes of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* and the phospholipase from *Fusarium oxysporum* and developed principally for degumming processes [9]. This new enzyme presented the stability of the lipase from *T. lanuginosus* and the activity of the enzyme from *F. oxysporum* [9]. However, few manuscripts may be found in the literature on the uses and biocatalyst design of this interesting enzyme [10–18].

In this paper, the effects of different chemical modifications on the diverse catalytic features of Lecitase have been studied. This enzyme, as lipases, has a catalytic mechanism the so-called

* Corresponding author at: Departamento de Biotecnología, ICP-CSIC, C/ Marie Curie 2, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 585 48 09; fax: +34 585 47 60.

E-mail addresses: rlf@icp.csic.es, rfernandezlafuente@hotmail.com (R. Fernandez-Lafuente).

¹ Both authors have evenly contributed to the paper.

Enzyme and Microbial Technology 60 (2014) 1–8



Contents lists available at ScienceDirect

Enzyme and Microbial Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/emt

Improving the catalytic properties of immobilized Lecitase via physical coating with ionic polymers



Jose C.S. dos Santos^{a,b,1}, Cristina Garcia-Galan^{a,1}, Rafael C. Rodrigues^c,
Hosiberto Batista de Sant' Ana^b, Luciana R.B. Gonçalves^b, Roberto Fernandez-Lafuente^{a,*}

^a Instituto de Catálisis-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^b Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Campus Do Pici, CEP 60455-760, Fortaleza, CE, Brazil

^c Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2014

Received in revised form 6 February 2014

Accepted 2 March 2014

Keywords:

Lecitase Ultra

Interfacial activation

Enzyme hyperactivation

Enzyme stabilization

Sulfate dextran

Polyethylenimine

ABSTRACT

Lecitase Ultra has been immobilized on cyanogen bromide agarose (via covalent attachment) and on octyl agarose (via physical adsorption on the hydrophobic support by interfacial activation). Both immobilized preparations have been incubated in dextran sulfate (DS) or polyethylenimine (PEI) solutions to coat the enzyme surface. Then, the activity versus different substrates and under different experimental conditions was evaluated. The PEI coating generally produced a significant increase in enzyme activity, in some cases even by more than a 30-fold factor (using the octyl-Lecitase at pH 5 in the hydrolysis of methyl phenyl acetate). In opposition, the DS coating usually produced some negative effects on the enzyme activity. The rate of irreversible inhibition of the covalent preparation using diethyl p-nitrophenylphosphate did not increase after PEI coating suggesting that the increase in Lecitase activity is not a consequence of the stabilization of the open form of Lecitase. Moreover, the coating greatly increased the stability of the immobilized Lecitase, for example using DS and the covalent preparation, the half-life was increased by a 30-fold factor in 30% acetonitrile. The stabilizing effect was not found in all cases, in certain cases even a certain destabilization is found (e.g., octyl-Lecitase-DS at pH 7). Thus, the effects of the ionic polymer coating strongly depend on the substrate, experimental conditions and immobilization technique employed.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Lecitase Ultra is an artificial chimera phospholipase A₁ developed mainly for degumming processes [1], although phospholipases A₁ have different uses in the industry [1–5]. This enzyme has been obtained from the fusion of the genes of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* (to obtain good stability) and the phospholipase from *Fusarium oxysporum* (to get the phospholipase activity) [6]. In some aspects, this enzyme behaves as a standard lipase, with capacity to become adsorbed on hydrophobic surfaces at low ionic strength (e.g., hydrophobic supports) [7] and presenting a broad specificity [8–16].

Lipases properties (selectivity, specificity) have been modulated via biocatalyst design [17]. For example, during immobilization their features are greatly altered. Due to the interfacial activation mechanism [18,19], their active center is very flexible and by involving specific areas of the enzyme in the immobilization, its activity, stability and even specificity and selectivity may be greatly altered [7,20,21]. This has been explained by the alteration of the closing/opening mechanism of lipases, or just by distorting the flexible active center [17]. Chemical modification is also a powerful tool to tune lipase properties, with some reports in the literature showing the potential of this strategy [22]. Chemical modification can be easily performed in previously immobilized enzyme, taking the advantage of solid phase modification and the possibility of having an enzyme with improved stability [23], being Lecitase one of the examples of catalytic properties tuning via chemical modification [24].

Another less explored possibility to alter the performance of immobilized lipases may be the coating of the enzyme surface using ionic polymers, like polyethylenimine (PEI) or dextran sulfate (DS) [25–27]. The coating via ionic exchange only requires areas of the

* Corresponding author at: Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis-CSIC, C/ Marie Curie 2, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.
Tel.: +34 91 585 49 41; fax: +34 585 47 60.

E-mail addresses: rfl@icp.csic.es, rfernandezlafuente@hotmail.com (R. Fernandez-Lafuente).

¹ These authors contributed equally to this work.

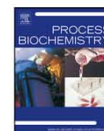
<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.03.001>
0141-0229/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Process Biochemistry 49 (2014) 1511–1515



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Stabilizing hyperactivated lecithase structures through physical treatment with ionic polymers



Jose C.S. dos Santos^{a,b}, Cristina Garcia-Galan^a, Rafael C. Rodrigues^c,
Hosiberto Batista de Sant'Ana^b, Luciana R.B. Gonçalves^b, Roberto Fernandez-Lafuente^{a,*}

^a ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^b Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Do Ceará, Campus Do Pici, CEP 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil

^c Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 27 May 2014

Keywords:
Lecitase
Enzyme hyperactivation
Detergents
PEI
Solid-phase physical modification
Bioimprinting

ABSTRACT

Lecitase Ultra has been covalently immobilized on cyanogen bromide cross-linked 4% agarose (CNBr) beads, maintaining 70% of the initial activity. The activity of the immobilized enzyme was improved in the presence of Triton X-100, sodium dodecyl sulfate (SDS), and cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) (e.g., up to 800% when using CTAB). However, CTAB and Triton X-100 presented a negative effect on enzyme stability even at low concentrations, and SDS cannot be used for a long time at 1% concentration. To maintain the hyperactivated conformation of the enzyme in the absence of detergent, ionic polymers were added during incubation of the immobilized enzyme in the presence of detergents. Coating the immobilized enzyme with polyethylenimine in aqueous buffer (PEI) produced a 3-fold increase in enzyme activity. However, in the presence of 0.1% SDS (v/v), this coating produced a 50-fold increase in enzyme activity. Using PEI and 0.01% (v/v) CTAB, the Lecitase activity decreased to 10%. Using irreversible inhibitors, it could be shown that the PEI/SDS-CNBr-Lecitase preparation allowed its catalytic Ser to be more accessible to the reaction medium than the unmodified CNBr-Lecitase.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The improvement of enzyme activity is one of the most interesting targets of biocatalyst design. This increase in activity has been achieved by modifying the enzyme features using several tools, such as site-directed mutagenesis [1], directed evolution [2,3] and chemical modification [4,5], among others.

However, it must be considered that, in most cases, enzymes are used at the industrial level in an immobilized form to permit their reuse (if the immobilized enzyme is stable enough) [6,7]. Thus, it may be interesting to develop strategies to improve enzyme activity during the preparation of the biocatalyst, which will be compatible with the strategy of directly improving enzyme performance via genetic tools [5,8]. Immobilization is, in many cases, associated with a decrease in enzyme activity for various reasons (e.g., enzyme

distortion, diffusion problems, steric problems). However, a proper immobilization protocol can maintain, and even increase, the activity of the enzyme [9]. The improvement in activity may be found in some cases by preventing some of the reasons for a reduction in enzyme activity, such as inhibition or distortion, while in other cases by producing a more active enzyme conformation [10].

Lipases have a catalytic mechanism called interfacial activation [11–13]. The active center is isolated from the reaction medium by an oligopeptide chain called “flap” or “lid” [14,15]. The internal face of the lid is hydrophobic and interacts with the hydrophobic areas surrounding the active center. This lid can be moved out exposing this very hydrophobic pocket to the medium. This conformation is unstable in an aqueous medium, causing the enzyme molecules to be in the “closed” conformation (i.e., without activity) most of the time. In the presence of its natural substrate (a drop of oil), the hydrophobic pocket permits the adsorption of the enzyme on its surface, stabilizing the open and active conformation of the lipase, and enabling the lipase to act in the interface of the oil drop and the aqueous system.

Lipases have also been hyperactivated during biocatalyst preparation by using conditions in which the enzyme structure is open and able to be further stabilized in this conformation. In

* Corresponding author at: Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis-CSIC, C/ Marie Curie 2, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 585 4941.

E-mail addresses: rfl@icp.csic.es, rfernandezlafuente@hotmail.com (R. Fernandez-Lafuente).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.009>
1359-5113/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

